

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. A. Kröncke

ATP-Spiegel und CO₂-Produktion von menschlicher Zahnplaque im Vergleich mit *Streptococcus mutans*

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Johannes Greger
aus Marktredwitz

1980

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. A. Kröncke

ATP-Spiegel und CO₂-Produktion von menschlicher Zahnplaque im Vergleich mit Streptococcus mutans

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Johannes Greger
aus Marktredwitz

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.1980

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546219_0079

Inhalt

Seite

A. <u>Themenstellung</u>	1
B. <u>Die mikrobiologische Flora der Zahnbeläge</u>	2
I. Anfänge und Hintergründe der Plaqueforschung	2
II. Definition und grobe prozentuale Zusammensetzung der Plaque	2
III. Die Matrix der Plaque	3
1. Zusammensetzung	3
2. Aufgabe	3
IV. Die Mikroorganismen der Plaque	4
1. Absolute Anzahl pro mg Naßgewicht	4
a) lebend und tot	4
b) lebend	4
c) Ursache für Diskrepanz zwischen a) und b)	5
2. Relative Verteilung pro mg Naßgewicht	5
a) Problematik	5
b) Ihre Abhängigkeit von:	6
(1) Alter	6
(2) Substratangebot	8
(3) Lokalisation	8
3. Die reife Plaque	9
a) Ihre bakterielle Flora	9
b) Die Streptokokken	9
V. Warum Str. mutans im metabolischen Vergleich mit reifer Plaque?	10

C. Die ATP-Bestimmung mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Biolumineszenz	11
I. Geschichte der Biolumineszenz und ihre Bedeutung heute	11
II. Adenosintriphosphat (ATP)	12
1. Strukturformel	12
2. Vorkommen und Bedeutung	12
III. Möglichkeiten der ATP-Bestimmung	13
1. Chemisch	13
2. Enzymatisch	13
IV. ATP-Bestimmung mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Reaktion	14
1. Reaktionsgleichung	14
2. Hintergrundlumineszenz	15
a) Ursache	15
b) Beseitigung durch:	15
(1) Reinigung des Leuchtkäferextraktes	15
(2) Steriles Arbeiten	16
(3) Ausschalten exogener Lichtquellen	16
3. Meßverfahren	16
a) Meßapparatur	16
b) Meßvorschrift	17
(1) Zeitpunkt der Messung	17
(2) Meßintervall	18
(3) Meßintegral	18
(4) Die ATP-Lumineszenzfunktion	18
c) Lumac-Celltester	19
4. Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von:	20
a) Temperatur und Zeit	20
b) pH-Wert	21
5. Einfluß der Extraktionsmethoden auf die Biolumineszenz	21
6. Interne Standardisierung	21
a) Zweck	21
b) Durchführung	22
c) Korrekturfaktor k und die Stabilität des ATP-Standard	22

	Seite
V. Die Biolumineszenz zur ATP-Bestimmung in menschlicher Zahnplaque	23
<u>D. Material und Methoden</u>	24
I. Plaqueentnahme	24
II. Plaqueaufbereitung	25
III. Anzucht der Str. mutans-Stämme T3/53 und 441	26
IV. Gewinnung und Aufbereitung der Bakterienproben	26
V. Extinktionsmessung	27
VI. Anaerobe Inkubation von Plaque- und Str. mutans-Proben im Warburgapparat	28
1. Erstellung der Ansätze	29
a) CO ₂ -Ansatz	29
b) ATP-Ansatz	29
c) Thermoansatz	29
2. Durchführung und Dauer des Warburgversuches	29
VII. Die ATP-Bestimmung	30
1. Reagenzien	30
2. Inbetriebnahme des Celltesters	31
3. Probenentnahme	31
4. ATP-Meßansatz	32
5. Berechnung der ATP-Menge pro mg Plaque- bzw. Str. mutans-Feuchtgewicht	33
VIII. Bestimmung und Berechnung der Säureproduktion	33
IX. Fluoreszenzmikroskopie	35
X. Vorrätige Reagenzien	35
1. ATP-Standard	35
2. Glukoselösung	36
3. Bicarbonatpuffer	36

XI.	Reinigung der Gefäße	36
1.	Glasküvetten	36
2.	Warburggefäße	36

E. Ergebnisse und Diskussion 37

I.	ATP-Standardkurve	37
----	-------------------	----

II.	ATP-Spiegel und CO_2 -Produktion in 15 wahllos entnommenen Plaqueproben	37
-----	---	----

1.	Der ATP-Spiegel	37
a)	Der Grundspiegel	37
b)	"ATP-pool-level" nach Inkubation im Warburggefäß	38
(1)	Einfluß des Bicarbonatpuffers	38
(2)	Einfluß der Begasung	39
c)	ATP-Spiegel nach Glukosezufuhr	41
2.	Die CO_2 -Produktion	44
3.	ATP-Spiegel und CO_2 -Produktion	45
a)	Die Konstanten K^* und K	45
b)	Die initiale Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-Spiegels	46
c)	Die Gegenregulation	47
d)	Der Abfall des ATP-Spiegels	48
e)	Der ATP-Verbrauch:	48
(1)	Nach Glukosezugabe	49
(2)	Nach Einsetzen der Gegenregulation	49

III.	ATP-Spiegel und CO_2 -Produktion von T3/53 und 441 22 und 46 Stunden nach Beimpfung	50
------	---	----

1.	Der ATP-Spiegel	50
a)	Der Grundspiegel	50
b)	"ATP-pool-level" nach Inkubation im Warburggefäß	51
(1)	Einfluß des Bicarbonatpuffers	51
(2)	Einfluß von 95 % N_2 und 5 % CO_2	52
c)	ATP-Spiegel nach Glukosezufuhr	54
2.	Die CO_2 -Produktion	55

3. ATP-Spiegel und CO_2 -Produktion	56
a) Die Konstanten K^* und K	56
b) Die initiale Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-Spiegels	57
c) Die Gegenregulation	58
d) Der Abfall des ATP-Spiegels	59
IV. Voraussetzungen für vergleichende Untersuchungen der Stoffwechselaktivität von Plaque und Str. mutans	60
1. Extinktionsmessung	60
2. Fluoreszenzmikroskopie	61
V. ATP-Spiegel und CO_2 -Produktion von 15 Plaqueproben im Vergleich mit Str. mutans	61
1. Der ATP-Spiegel	62
a) Der Grundspiegel	62
b) ATP-Spiegel nach Inkubation im Warburggefäß	62
(1) Einfluß des Bicarbonatpuffers	62
(2) Einfluß der Begasung	63
c) ATP-Spiegel nach Glukosezufuhr	63
(1) Der initiale Anstieg	63
(2) Die Gegenregulation	64
2. Die CO_2 -Produktion	65
a) Die CO_2 -Endkonzentration/ CO_2 -Ansatz	65
b) Die CO_2 -Produktionsrate	66
3. Korrelation zwischen ATP-Spiegel und ATP-Produktion	67
a) Die Konstante K	67
(1) Definition	67
(2) Anwendungsmöglichkeiten	68
(3) Größe der Konstante K	68
b) K und die CO_2 -Produktionsrate	69
c) K und die Stoffwechselleistung	69
F. <u>Zusammenfassung</u>	72
G. <u>Literaturverzeichnis</u>	1 - 9
H. <u>Abbildungen und Tabellen</u>	1 - 10
I. Abbildungen	1 - 8
II. Tabellen	9 - 10

A. Themenstellung

Seit die "Plaque" als ätiologischer Faktor der Karies erkannt wurde, ist und bleibt sie zentrales Thema der Kariologie. Vielfältige Erkenntnisse über katabolen und anabolen Stoffwechsel der Plaquemikroorganismen verdanken wir Studien an isolierten Einzelstämmen, wogegen die Stoffwechselleistungen und Regulationsvorgänge innerhalb der gemischten Bakterienpopulation weitgehend unerforscht blieben.

In der vorliegenden Studie wird der Versuch unternommen, wahllos entnommene menschliche Plaqueproben in ihrem Stoffwechsel- und Regulationsverhalten anhand des zellulären ATP-Spiegels und dessen Reaktion auf exogene Substratzufuhr zu charakterisieren. Dabei dient *Str. mutans*, einer der häufigsten Besiedler menschlicher Zahnbeläge, als Vergleich.

Vor einer näheren Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit ist ein Einblick in die mikrobiologische Flora der Zahnbeläge und eine Beschreibung des hochempfindlichen ATP-Meßverfahrens mit Hilfe der Leuchtkäfer-Biolumineszenz unumgänglich.

B. Die mikrobiologische Flora der Zahnbeläge

- I. Als im 17. Jahrhundert der in Delft lebende Kaufmann und Naturforscher van Leeuwenhoek (1632 - 1723) zum ersten Mal Plaqueausstriche unter seinen selbstgebauten Mikroskopen betrachtete und seine Entdeckung von kleinsten Lebewesen der Öffentlichkeit mitteilte, wurde er von den damaligen Vertretern der Wissenschaft nur belächelt.

Erst 200 Jahre später gelang es dem amerikanischen Zahnarzt W.D. Miller, unterstützt durch neue bakteriologische Erkenntnisse (Koch), die Mikroorganismen der Zahnbeläge und deren Säureproduktion als ursächlichen Faktor im Kariesgeschehen nachzuweisen. Diese von ihm 1880 aufgestellte chemo-parasitäre Kariestheorie wurde in der Folgezeit durch weitere Modellvorstellungen, wie der Proteolyse- und Chelationstheorie ergänzt, welche ebenfalls auf dem Vorhandensein einer Bakterienkultur in Form von Zahnbelägen aufbauen.

Heute ist anerkannt, daß die Zahnkaries als ein multifaktorielles Geschehen aufzufassen ist, das durch das Ineinandergreifen der folgenden 4 Faktoren verursacht wird: Wirt, Substrat, Zeit und Mikroorganismen (Keyes, 1962; König, 1971).

- II. Die Bezeichnung "Plaque" wurde zuerst von Black (1898) benutzt, um die filzartige Masse von Mikroorganismen zu beschreiben, die möglicherweise erstmals von Williams (1897) an der Oberfläche menschlichen Zahnschmelzes beschrieben wurde.

In Anlehnung an das Kariessymposium der DFG in Münster, 1964, verstehen wir heute darunter: "festhaftende Mucoproteidbeläge mit aktiven Mikroorganismen unter Beimengung von Nährsubstraten", die mit Wasserspray nicht entfernt werden können. Etwa 70 Volumenprozent (Schroeder, 1969; Sharma u. Newbrun, 1975) dieses Bakterienrasens bestehen aus Mikroorganismen, die durch eine glykoprotein- und polysaccharidreiche Matrix zusam-

mengehalten werden. Trotz dieser dicht zusammengedrängten Bakterienmischkultur ist der Wassergehalt in Prozent des Naßgewichts mit durchschnittlich 78,9 % sehr hoch (78 %: Dawes u. Jenkins, 1962; 80 - 84 %: Huh u. Mitarbeiter, 1959; Jenkins, 1966; 79,51 %: Ahrens u. Mitarbeiter, 1964¹⁾; 76 %: Gülzow u. Mardaus, 1973; 78 - 80 %: Sharma u. Newbrun, 1975). Es folgen mit 10 % des Naßgewichts anorganische Bestandteile wie Phosphat, Kalium, Natrium und Calcium, während sich die restlichen Prozente auf den Proteingehalt mit 8 - 10 %, den Kohlenhydratanteil mit 2,6 - 3,4 % und die Lipidfraktion mit 1 - 2,8 % verteilen (Sharma u. Newbrun, 1975²⁾).

III.1. Hauptbestandteil der Matrix mit 2 % des Naßgewichts sind nicht nur - wie bisher angenommen - die extrazellulären Polysaccharide Dextran und Lävän (Schroeder, 1969), sondern die verschiedensten Polyglukane- und fruktane (Guggenheim u. Newbrun, 1969³⁾; Guggenheim, 1970³⁾; Burnett, Sherp u. Schuster, 1976), sowie einige Teichonsäuren (Rölla, 1976).

2. Aufgabe dieser klebrigen Kittsubstanz ist es, die einzelnen Bakterienkolonien zusammenzuhalten und am Zahn zu befestigen. Hat die Plaque nach einigen Tagen ihre durch den natürlichen Wangen- und Zungenabrieb limitierte Dicke erreicht, so dient die Matrix als Diffusionsbarriere für den säureneutralisierenden Speichel. Ihre Funktion als Reservestoff ist lediglich auf das leichtlösliche Lävän beschränkt, denn die Streptokokken der Mutans- und der

1) Errechnet aus Mittelwert des Trockengewichtes = 5,15 mg und durchschnittlichem Naßgewicht = 19,99 mg von 12 wahllos entnommenen Plaques.

2) Prozentangaben wurden von Trockengewicht auf Naßgewicht umgerechnet, bei einem durchschnittlichen Wassergehalt der Plaque von 78 - 80 %.

3) Aus König, 1971.

Sanguisreihe besitzen zwar die nötigen Glucosyltransferasen, um aus Saccharose - daneben auch Glukose (Critchley u. Bowen, 1970³⁾; Van der Hoeven, 1971³⁾) - Dextran, Glukan und Mutan (König, 1971; Burnett, Sherp u. Schuster, 1976) zu bilden, die entsprechenden abbauenden Enzyme fehlen ihnen jedoch.

IV. Für Studium und anschließende Interpretation der biochemischen Stoffwechselleistungen einer entnommenenen Plaque ist eine genaue Kenntnis von der Art und Menge ihrer Hauptkomponente, der Bakterien, erforderlich.

1.a) Ersten Aufschluß über die absolute Anzahl von lebenden und toten Organismen pro mg Plaquenaßgewicht liefert die mikroskopische Auszählung von gefärbten Ausstrichpräparaten. Während Kligler⁴⁾ 1915 noch 5×10^7 Mikroorganismen pro mg Naßgewicht zählte, konnte Strålfors 1950 bereits 4×10^8 Bakterien pro mg Feuchtgewicht nachweisen. Die heutigen Zahlenangaben liegen zwischen $1,17 \times 10^8$ /mg (Burnett, Sherp u. Schuster, 1976) und 2×10^8 /mg (Socransky u. Mitarbeiter, 1963; Poole u. Mitarbeiter, 1967; Gordon u. Mitarbeiter, 1971; Poole u. Gilmour, 1971) und zeigen hiermit eine bemerkenswert geringe Schwankungsbreite.

b) Wollte man allerdings nur die Anzahl der lebenden Mikroorganismen einer Zahnplaque bestimmen, mußte man sich einer anderen mikrobiologischen Verfahrensweise bedienen. Die Auszählung von einzelnen Bakterienkolonien, welche sich nach Beimpfung eines möglichst universellen Nährmediums mit einer verdünnten Plaque-

³⁾ Aus König, 1971.

⁴⁾ Aus Burnett, Sherp u. Schuster, 1976.

suspension und anschließender Bebrütung bildeten, ergab ganz unterschiedliche Werte, die alle um ca. 90 % niedriger lagen als die mikroskopisch ermittelten (Strålfors, 1950).

- c) Ursache für diese wesentlich geringere Ausbeute ist einerseits die größtenteils mit Ultraschall durchgeführte Dispersion der Plaqueprobe, die nicht nur unvollständig ist, so daß einer koloniebildenden Einheit ein Konglomerat von Einzelbakterien zuzuordnen ist (Burnett, Sherp u. Schuster, 1976; Robrish u. Mitarbeiter, 1978; Kellner u. Mitarbeiter, 1979), sondern auch sehr empfindliche Bakterien abzutöten vermag (Robrish u. Mitarbeiter, 1978). Andererseits gibt es bis heute noch kein universelles Kulturmedium, das den Bedürfnissen aller Plaquemikroorganismen gerecht werden könnte. Trotzdem ist es mit Hilfe verfeinerter Kulturbedingungen gelungen, den von Strålfors 1950 mit 10 % bezeichneten kultivierbaren Anteil der Gesamtplaque auf 70 % zu erhöhen (Gordon u. Mitarbeiter, 1971), um damit der auf biochemischen Weg ermittelten Anzahl von lebenden Plaquemikroorganismen unter Verwendung des bakteriellen ATP-Spiegels (Robrish u. Mitarbeiter, 1978) entscheidend näher zu rücken.
- 2.a) Ist man sich heute über die absolute Anzahl der Mikroorganismen pro Plaquegewichtseinheit einig, so weichen die Angaben über Art und prozentuale Verteilung der Einzelbakterien doch stark voneinander ab. Das liegt größtenteils in der mikrobiologischen Methodik begründet, die bis heute nicht in der Lage ist - ob mit universellen oder selektiven Nährmedien - das Biotop einer gemischten Bakterienpopulation zu simulieren (Burnett, Sherp u. Schuster, 1976; Robrish u. Mitarbeiter, 1978; Kellner u. Mitarbeiter, 1979); hinzu kommen Identifizierungsprobleme, welche auf der veränderten Erschei-

nungsform von Mikroorganismen auf einem künstlichen Kulturmedium (Pleomorphismus) beruhen (Theilade u. Mitarbeiter, 1978; Kellner u. Mitarbeiter, 1979; Sauerwein, 1974). Größte Schwierigkeiten allerdings bereitet die Tatsache, daß eine Zahnplaque in ihrer Zusammensetzung je nach Alter, Lokalisation und Proband stark variiert (Pilz, Plathner u. Taatz, 1969/1975; Bowden, Hardie u. Slack, 1975; Kellner u. Mitarbeiter, 1979) und es kaum gelingen wird, zwei identische Plaqueproben zu gewinnen (Kellner u. Mitarbeiter, 1979). Fast unlösbar scheinen die Probleme, will man auch die vom Sauerstoffpartialdruck abhängige, unregelmäßige Verteilung von Mikroorganismen innerhalb der Plaque berücksichtigen (Bramstedt u. Trautner, 1971). Auf eine aerobe Außenzone folgt eine Übergangszone für fakultativ anaerobe Bakterien, bis, ab einer Tiefe von 0,32 mm von der Außenfläche gemessen, der Sauerstoffpartialdruck auf Null abgesunken ist (Strålfors, 1957⁵⁾) und nur noch anaerobes Leben möglich ist.

- b)(1) Um die prozentuale Verteilung von Mikroorganismen in einer reifen, etwa einer Woche alten Plaque zu verstehen, muß man auf die Plaqueentwicklung, die man grob in zwei Abschnitte einteilen kann, eingehen.

Nachdem sich der Zahn durch Niederschlag von negativ geladenen Speichelglykoproteinen und Blutgruppensubstanzen am amphoteren Hydroxylapatit mit einem ca. 15 µm starken Schmelzoberhäutchen (Pellicle) überzogen hat, setzt die eigentliche Belagbildung ein (Rölla, 1976). Bei der beginnenden Bakterienaggregation sind neben interbakteriellen Anziehungskräften sog. Agglutinationsfaktoren des Speichels beteiligt (Rölla, 1976).

⁵⁾Aus König, 1971.

Zu den Erstbesiedlern zählen gram-positive Stäbchen und Kokken, die etwa 90 % der Anfangsflora ausmachen und deren Hauptvertreter die fakultativ anaeroben Streptokokken sind. Als Bildner von extrazellulären Polysacchariden schaffen sie gute Haftmöglichkeiten für weitere Mikroorganismen (Ranke u. Mitarbeiter, 1967; Ranke u. Ranke, 1970; Rölla, 1976), wie die gram-positiven, fakultativ anaeroben Leptotricheen (große Filamente) und die ebenfalls gram-positiven, aeroben Nocardien (kleine Filamente). Zusammen mit den Neisserien, gram-negative, aerobe Kokken, beträgt ihr Anteil an den Mikroorganismen dieser ersten, aeroben Phase der Plaqueentwicklung, die etwa zwei Tage nach dem letzten Zähneputzen beendet ist, nur 10 % (Löe u. Mitarbeiter, 1965⁶⁾; Theilade u. Mitarbeiter, 1966⁶⁾⁷⁾; Carlson u. Egelberg, 1965⁷⁾; P. Riethel).

In der Zeit vom 2. - 4. Tag vermehren sich die gram-negativen Kokken und Stäbchen weiter: Veillonellen (anaerobe, gram-negative, kleine Kokken) und Fusobakterien (anaerobe, gram-negative Stäbchen und Filamente) treten hinzu. Das filamentöse Wachstum dieser zweiten Entwicklungsperiode wird durch die Actinomyceten und Korynebakterien - beides Filamente - ergänzt, die allerdings zusammen mit den Fusobakterien nur 7 % der Gesamtflora ausmachen.

Die dritte und letzte Entwicklungsphase erstreckt sich vom 4. bis zum 9. Tag und wird charakterisiert durch neu auftauchende, fadenförmige, anaerobe Keime, den Spirillen und Spirochäten, die mit 2 % an der gesamten Bakterienpopulation beteiligt sind. Nach 7 Tagen hat sich das Verhältnis der verschiedenen Bakterien so zugunsten anaerober Mikroorganismen verschoben, daß die ursprüng-

6) Aus König, 1971.

7) Aus Egelberg, 1970.

lich dominierenden, gram-positiven Kokken und Stäbchen nur noch die Hälfte der Plaqueflora einnehmen (Löe u. Mitarbeiter, 1965⁸⁾; Howell u. Mitarbeiter, 1965⁸⁾; Carlson u. Egelberg, 1965⁹⁾; Theilade u. Mitarbeiter, 1966⁸⁾⁹⁾; Ritz, 1967⁸⁾; P. Riethe).

- (2) Doch nicht nur das Alter beeinflußt die bakterielle Zusammensetzung einer Plaque, sondern auch das unterschiedliche Substratangebot in Form der Ernährungsweise. Gehring zeigte 1969, daß zuckerreiche Diät zu einer Dominanz von kariogenen Streptokokkenstämmen wie *Str. mutans* führt, während nicht-kariogene Keime bei hohem Zuckerkonsum nicht vermehrungsfähig bleiben.
- (3) Benötigt man zu experimentellen Zwecken mit der Warburgapparatur größere Plaqueproben (> 20 mg), so ist eine Entnahme aus mehreren Gebißquadranten und von ganz unterschiedlichen Regionen des Einzelzahnes unumgänglich. Ist eine drei Tage alte Plaque aus den 4 Quadranten eines Probanden bezüglich ihrer chemischen Bestandteile (Wassergehalt, Trübung, gesamte nichtflüchtige Substanzen, Protein, Gesamtstickstoff) annähernd gleich zusammengesetzt (Gülzow u. Mardaus, 1973), so ist das für die prozentuale Aufteilung der Mikroflora keinesfalls bewiesen. Betrachtet man Fissuren- und Glatflächenplaque im Vergleich, so zeigen Studien an implantierten künstlichen Fissuren (Theilade u. Mitarbeiter, 1973) als auch Fissuren von extrahierten Weisheitszähnen (Theilade u. Mitarbeiter, 1978) eine vom bisher Gesagten abweichende Mischflora. Fusobakterien, Spirillen und Spirochäten fehlen in der Fissurenplaque; auch das Verhältnis lebender zu toter Organismen ist zugunsten der abgestorbenen Keime verschoben.

⁸⁾Aus König, 1971.

⁹⁾Aus Egelberg, 1970.

3.a) Eine reife, 7 - 9 Tage alte Plaqueprobe, zusammengesetzt aus multilokulären Einzelproben - entsprechend der experimentell benötigten Menge - besteht also aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Bakterien. Unter den 24 von Hemmens u. Mitarbeiter, 1946, isolierten Stämmen befinden sich 75 % obligate und fakultative Anaerobier und 25 % aerobe Keime (Pilz, Plathner u. Taatz, 1969/1975). Das Übergewicht der anaeroben, besonders aber der fakultativ anaeroben Mikroorganismen (König, 1971) beruht auf der im Inneren der reifen Plaque vorherrschenden, stark reduzierten Atmosphäre mit einem Redoxpotential von - 141 mV (Kenny u. Ash, 1969). Auf diese Bedingungen ist es zurückzuführen, daß die weitgehend anaerobe Bakterienpopulation der Plaque nicht identisch mit der mehr aeroben Speichelflora ist (Pilz, Plathner u. Taatz, 1969/1975).

b) Eine sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht wichtige Bakterienart der reifen Plaque ist die Gruppe der Streptokokken, welche Siebert¹⁰⁾ um 1900 aus kariösem Dentin isoliert hat. Während sich die frühe Kariesforschung hauptsächlich den Laktobazillen widmete (Howe u. Hatch, 1917), stehen heute die wesentlich zahlreicher in der ausgereiften Plaque vertretenen Streptokokken im Mittelpunkt der Kariologie. 25 % der lebenden (Burnett, Sherp u. Schuster, 1976) und durchschnittlich 72,5 % der kultivierbaren (75 %: Kligler, 1915¹⁰⁾; Pilz, Plathner u. Taatz, 1969/1975; 71 %: Theilade u. Theilade, 1970; 70 %: Strålfors, 1950) Plaqueflora sind Streptokokken. Ihre prozentual wichtigsten Vertreter sind *Str. mutans* mit 25 - 90 % und *Str. sangius* mit 15 - 93 % aller Plaquestreptokokken (Burnett, Sherp u. Schuster, 1976).

Beide Streptokokkenstämme wurden im gnotobiotischen Rat-

¹⁰⁾ Aus Burnett, Sherp u. Schuster, 1976.

tenversuch als äußerst kariogene Spezies eingestuft. Aufgrund ihres raschen und hohen Säurebildungsvermögens, sowie ihrer starken Durchsetzungskraft gegenüber anderen Keimen, wird ihnen große Bedeutung am Kariesinitial zuge-messen (Ranke u. Ranke, 1970). Als Erstbesiedler mit der Fähigkeit, extra- und intrazelluläre Polysaccharide zu bilden, spielen sie auch für die Plaquegenese eine fundamentale Rolle (Ranke u. Ranke, 1970). Trotzdem sollte man bei diesen Betrachtungen nicht die Funktion der restlichen Plaqueflora aus dem Auge verlieren, denn nur durch das symbiotische Miteinander aller Keime ist eine Zahnplaque lebensfähig.

- V. Will man die metabolische Aktivität einer Plaqueprobe richtig verstehen, kommt man nicht umhin, einen Vergleich mit ihren wichtigsten Besiedlern, *Str. mutans* und *Str. sanguis*, anzustellen. Nachdem Robrish u. Mitarbeiter (1978) *Str. sanguis* für Untersuchungen an tierischer Plaque verwendet haben, lag eine Gegenüberstellung der Stoffwechselleistung von *Str. mutans* und menschlicher Zahnplaque nahe.

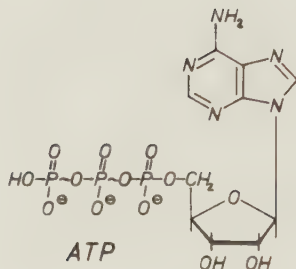
C. Die ATP-Bestimmung mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Biolumineszenz

I. Im Jahre 1887 entdeckte Dubois bei seinen Untersuchungen über die lumineszierende Venusmuschel (*Pholas dactylus*) eine hitzestabile Substanz, die er Luciferin nannte und ein hitzelabiles Enzym, das den Namen Luciferase erhielt.

In seinen Versuchen mit der Krebsart *Cypridina hilgendorffii* bemerkte Harvey 1940, daß die Vermengung des Substrates Luciferin mit dem Enzym Luciferase von einer kurzdauernden, irreversiblen Lichtreaktion begleitet wird. Nach dieser qualitativen Entdeckung konnte McElroy im Jahre 1947 zum ersten Mal zeigen, daß ein wässriges Extrakt aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* nach Abnahme der Lichtemission durch zugefügte Mengen von ATP wieder zum Leuchten gebracht werden kann, und daß die Dauer des Lichtblitzes der ATP-Konzentration direkt proportional ist. Nachdem McElroy und Strehler bereits 2 Jahre später herausfanden, daß neben Luciferin, Luciferase und ATP auch noch Sauerstoff und ein zweiwertiges Kation (Mg^{2+}) für die ablaufende Lichtreaktion erforderlich sind, verwendeten Strehler und Totter 1952 erstmals die Biolumineszenz zur *in vitro*-Bestimmung von ATP.

Seither hat sich die Quantifizierung von ATP mit Hilfe des Leuchtkäferextraktes zu einem der empfindlichsten und gebräuchlichsten Meßverfahren entwickelt, das in jüngster Zeit auch zur Aufzeichnung der Reaktionskinetik von ATP-umwandelnden Reaktionen Verwendung findet (Lundin u. Mitarbeiter, 1976; Brovko u. Mitarbeiter, 1978).

II.1.



2. Adenosinetriphosphat (ATP) ist sowohl Produkt als auch Bestandteil aller lebenden Zellen und wird mit dem Zelltod (Zellyse) sofort in unwirksame Bruchstücke aufgespalten. Seine Gegenwart ist von essentieller Bedeutung für alle lebenden Organismen; ATP gilt somit als Indikator für Lebensfähigkeit schlechthin (Hunnekens u. Whitley, 1960; Lehninger, 1965). Als energiereiche Verbindung ist ATP Produkt des Energiestoffwechsels und gleichzeitig Ausgangsstoff für sämtliche Syntheseleistungen einer Zelle. In seiner Aufgabe als Verbindungsglied von katabolem und anabolem Stoffwechsel erfüllt es gleichfalls wichtige regulatorische Funktionen an den Schrittmacherenzymen des Zellmetabolismus. Trotz seiner relativ kleinen, intrazellulären Konzentration von etwa 10^{-3} M ist seine Synthese- und Abbaurate so groß¹¹⁾, daß ein Vielfaches des zellulären

¹¹⁾ Die Verweildauer eines ATP-Moleküls im ATP-pool beträgt 0,24 - 0,13 sec (Holms u. Mitarbeiter, 1971).

ATP-Spiegels (engl.: "ATP pool level") produziert wird. Ein Mensch bildet z. B. täglich 70 kg ATP, also ungefähr sein eigenes Körpergewicht (Karlson, 1974; Buddecke, 1974). Da ATP bei fast allen biochemischen Reaktionen beteiligt ist, bildet seine Bestimmung einen Schwerpunkt der analytischen Biochemie.

III.1. Sowohl Verfahren, welche sich der Schwerlöslichkeit bestimmter Phosphat- oder Adeninverbindungen zu Nutze machten als auch Trennmethoden mit Hilfe von Ionenaustauschchromatographie an PEI-Cellulose (Polyäthylimin-Cellulose) mit anschließender ATP-Bestimmung im Eluat (Cohn u. Carter, 1950¹²⁾; Hurbert u. Mitarbeiter, 1954¹²⁾; Randerath u. Randerath, 1967¹³⁾), zeichneten sich durch zu geringe Empfindlichkeit und zu hohen Zeitaufwand aus.

2. Sie wurden schließlich durch einfachere und empfindlichere enzymatische Bestimmungsmethoden im optischen Test (Warburg, 1935) verdrängt. Verwendung fanden hauptsächlich ATP-umwandelnde Reaktionen des Kohlenhydratstoffwechsels, wie der Zuckerabbau über die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Glyceratkinase oder über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; daneben wurden auch ATP-abbauende Enzyme wie die Apyrase, eine ATP-ase aus Kartoffeln, sowie Myosin-ATP-ase, Phosphatase und Myokinase benutzt.

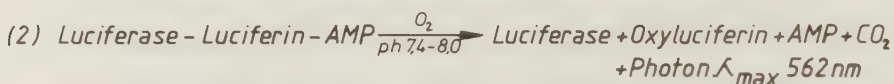
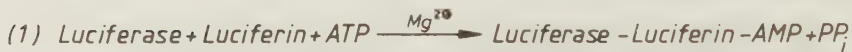
Doch keine dieser Methoden fand ein solches Echo, wie die 1952 von Strehler und Totter zum ersten Mal angewandte quantitative Bestimmung von ATP mit Hilfe von Luciferin-Luciferase-Extrakten aus Leuchtkäfern. Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens erlaubt heute sogar die Messung des ATP-Spiegels einer einzelnen Zelle (Wettermark u. Mitarbeiter, 1975). Bis dahin mußten jedoch viele Ver-

¹²⁾Aus Kalbhen u. Koch, 1967.

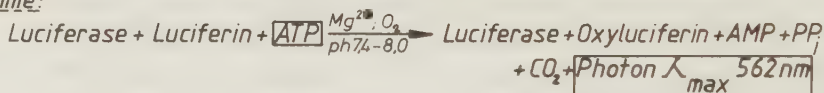
¹³⁾Aus Triplett u. Mitarbeiter, 1977.

besserungsvorschläge und Modifikationen eingebracht werden, welche alle der Empfindlichkeitssteigerung und der Vermeidung von Fehlern dienen.

IV.1.



Summe:



Die dargestellte Summengleichung (Kalbhen u. Koch, 1967; Karl und Holm-Hansen, 1976) der Lumineszenzreaktion zerfällt demnach in zwei Einzelreaktionen, wobei Luciferin durch Bildung des energiereichen Enzym-Coenzym-Substratkomplexes, bestehend aus Luciferase, ATP und Luciferin, unter Einwirkung von molekularem Sauerstoff und Magnesiumionen in Oxyluciferin umgewandelt wird. Dabei wird pro Molekül verbrauchten Adenosintriphosphats und gebildeten Oxyluciferins ein Lichtquant frei. Diese theoretische Mol-zu-Mol-Beziehung wird durch Störfaktoren wie Hintergrundlumineszenz, verschiedene Meßverfahren, variierende Aktivität der Enzympräparation als Folge von Temperatur- und pH-Schwankungen, sowie unterschiedliche Extraktionsmethoden aufgehoben, so daß die Verwendung eines ATP-Standard unumgänglich ist. Hierbei genügt es nicht, mehrere Messungen auf einen bestimmten ATP-Standardwert zu beziehen; vielmehr muß dieser zu jeder Einzelmessung neu ermittelt werden, um die multiplen Fehlermöglichkeiten weitgehend auszuschalten. Vorteil und Durchführung dieses

Verfahrens der internen Standardisierung (engl.: "internal standard") werden am Ende dieses Kapitels beschrieben.

2. Reduktion der Hintergrundlumineszenz (engl.: "background") war Gegenstand sämtlicher Forschung, die sich eine Steigerung der Empfindlichkeit der Lumineszenzreaktion zum Ziel setzte.

a) Sie wird verursacht durch endogenes ATP und Luciferin in unvollständig gereinigten Leuchtkäferextrakten. Beseitigung des "background" ist also unmittelbar mit einer verbesserten Reinigung des Luciferin-Luciferase-Enzympräparates verbunden.

b)(1) Eine Reinigung haben u.a. vorgeschlagen: Lyman u. DeVincenzo, 1967; Rasmussen u. Nielsen, 1968; Nielsen u. Rasmussen, 1968; Tsujimoto u. Mitarbeiter, 1970; Cortenbosch u. Schram, 1971; Neufeld u. Mitarbeiter, 1975; Karl u. Holm-Hansen, 1976. Hierbei stehen folgende Möglichkeiten zur Wahl:

- Inkubation des Glühwürmchenextraktes mit Apyrase; dabei wird endogenes ATP enzymatisch abgebaut (Lyman u. DeVincenzo, 1967).
- Inkubation mit exogenem Luciferin, um das Gleichgewicht der Lumineszenzreaktion auf die Produktseite zu verschieben (Cortenbosch u. Schram, 1971).
- Stehenlassen des Präparates für einige Stunden bei 4° C, damit freies ATP wieder gebunden und einer enzymatischen Reaktion entzogen wird. Durch kräftiges Schütteln vor der eigentlichen Meßreaktion werden allerdings die Bemühungen zunichte gemacht (Rasmussen u. Nielsen, 1969; Tsujimoto u. Mitarbeiter, 1970; Neufeld u. Mitarbeiter, 1975; Conn u. Mitarbeiter, 1975; Karl u. Holm-Hansen, 1976).
- Steigerung der spezifischen Luciferaseaktivität durch Gel-Filtration an Sephadex-Säulen (Rasmussen u.

Nielsen, 1969; Nielsen u. Rasmussen, 1968; Cortenbosch u. Schram, 1971), fraktioniertes Aussalzen mit Ammoniumsulfat (Neufeld u. Mitarbeiter, 1975), sowie Zentrifugation und sterile Filtration des Leuchtkäferextraktes (Rasmussen u. Nielsen, 1968).

- Verdünnen des Enzympräparates, um die Konzentration von endogenem ATP und des Inhibitors der Lichtreaktion, Dehydroluciferin, zu verringern (Karl u. Holm-Hansen, 1976).

(2) Doch nicht nur ungenügend gereinigte Leuchtkäferextrakte, sondern auch mit Bakterien verschmutzte Küvetten und Reagenzien erhöhen den Leerwert der Biolumineszenz (Hammerstedt, 1973).

(3) In gleicher Weise wirken direkt in die Meßkammer einfallendes Licht und phosphoreszierende Glas- und Kunststoffküvetten aufgrund zu hoher oder zu langer Lichtexposition (Hammerstedt, 1973).

3.a) Wesentliche Fortschritte bezüglich der Empfindlichkeit der Lichtreaktion verdanken wir neu entwickelten und verbesserten Lichtdetektoren. Während Strehler und Totter 1952 mit einem Quantenzähler 1 ng ATP gerade noch nachweisen konnten, liegen die mit Flüssigkeits-Szintillationszählern und hochempfindlichen Photometern erfassbaren ATP-Werte im Pikomolbereich (Rasmussen u. Nielsen, 1968; Neufeld u. Mitarbeiter, 1975; Conn u. Mitarbeiter, 1975). Sowohl die Flüssigkeits-Szintillationszähler- bis her für die Messung von radioaktiven Substanzen verwendet und erstmals von Tal u. Mitarbeiter 1964 für die Biolumineszenz umgebaut - als auch die verbesserten Photometer verdanken ihre Empfindlichkeitssteigerung hochsensiblen Photozellen, sog. Photomultipliern.

Zusätzliche Fokussierung des emittierten Lichtes mittels geeigneter Spiegel- und Linsenanordnung (Lyman u.

DeVincenzo, 1967), sowie Kühlung der Photozellen (Wettermark u. Mitarbeiter, 1975), erhöhen die Lichtausbeute und damit die Sensitivität.

- b) (1) Eine alleinige Steigerung der Empfindlichkeit des Lichtempfängers würde die Sensitivität des gesamten Meßverfahrens nur merklich erhöhen, gelänge es nicht gleichzeitig, die Latenzzeit zwischen Mischen von Probe und Reagenz und dem Beginn der eigentlichen Messung zu verkürzen. Dies erfolgt mit Hilfe einer elektronisch getriggerten und pneumatisch betriebenen Einspritzvorrichtung (Lyman u. DeVincenzo, 1967; Hammerstedt, 1973; Johnson u. Mitarbeiter, 1974; Cheer u. Mitarbeiter, 1974). Die kürzere Mischzeit mit anschließendem Triggerimpuls an die Lichtdetektoren ermöglicht eine Registrierung des initialen "overshoot" der Lichtreaktion, welcher ein Vielfaches des Leerwertes beträgt und nach ca. 1 sec beendet ist (Rasmussen u. Nielsen, 1968; Lumac-Bedienungshinweise). Danach fällt die Lichtkurve bei niedrigen ATP-Konzentrationen schnell auf den Wert der Hintergrundlumineszenz ab (Wettermark u. Mitarbeiter, 1975). Je empfindlicher also das Meßverfahren, umso wichtiger ist eine Erfassung des anfänglichen Lichtgipfels. So konnten Verfahren, die die Höhe des "overshoot" zur ATP-Bestimmung ausnutzten (Lyman u. DeVincenzo, 1967; Tsujimoto u. Mitarbeiter, 1970; Wettermark u. Mitarbeiter, 1975) im allgemeinen eine höhere Empfindlichkeit aufweisen als Methoden, die mit einer Latenzzeit von einigen Sekunden (Tal u. Mitarbeiter, 1964¹⁴⁾; Aledort u. Mitarbeiter, 1966¹⁴⁾; Cole u. Mitarbeiter, 1967; Stanley u. Williams, 1969¹⁴⁾; Hammerstedt, 1973), oder sogar von 30 Sekunden (Aledort u. Mitarbeiter, 1966¹⁴⁾ arbeiteten.

¹⁴⁾ Aus Kimmich u. Mitarbeiter, 1975.

- (2) Ebenso unterschiedlich wie der Zeitpunkt der Lichtmessung nach Vermengung von Luciferaseextrakt mit der ATP-Lösung sind die verwendeten Meßintervalle. Während Verfahren mit Aufzeichnung des initialen Lichtblitzes (Lyman u. DeVincenzo, 1967; Tsujimoto u. Mitarbeiter, 1970; Wettermark u. Mitarbeiter, 1975) mit sehr kurzer Meßdauer auskommen, registrieren ATP-Messungen mit größerer Latenzzeit meist über einen längeren Zeitraum von 5 - 10 sec (Tal u. Mitarbeiter, 1964¹⁵); Aledort u. Mitarbeiter, 1966¹⁵); Cole u. Mitarbeiter, 1967; Kalbhen u. Koch, 1967; Stanley u. Williams, 1969¹⁵); Tsujimoto u. Mitarbeiter, 1970; Hammerstedt, 1973).

Daneben finden sich auch noch 30 sec-Intervalle (Aledort u. Mitarbeiter, 1966; John, 1970) und im anderen Extremfall sogar eine Registrierzeit von nur 1 sec (Addanki u. Mitarbeiter, 1966¹⁵) als Meßvorschrift für die Lumineszenzreaktion.

- (3) Addiert man die Einzelwerte eines Meßintervalls im Sinne einer Integralfunktion, so erhält man die Fläche unterhalb der Lumineszenzkurve in diesem Zeitabschnitt. Integration über 6 sec (Kalbhen u. Koch, 1969) oder 30 sec (John, 1970) erhöht nicht nur die Empfindlichkeit, sondern auch die Reproduzierbarkeit der Biolumineszenz (Standardabweichung 2 %: John, 1970).
- (4) Einer derartigen Fülle von Meßvorschriften steht eine fast gleichgroße Zahl von möglichen Korrelationen zwischen ATP-Konzentration und emittierter Lichtmenge gegenüber. Eine lineare Beziehung zwischen gemessener Lumineszenz und ATP-Konzentration berichten Addanki u. Mitarbeiter, 1966¹⁵); Aledort u. Mitarbeiter, 1966¹⁵); Lyman u. DeVincenzo, 1967; Rasmussen u. Nielsen, 1968; sowie John, 1970. Kalbhen u. Koch (1967) verwendeten

¹⁵) Aus Kimmich u. Mitarbeiter, 1975.

wie John (1970) das Integral der Lichtreaktion - allerdings über ein kürzeres Meßintervall - zur Berechnung der ATP-Menge; sie erhalten jedoch eine quadratische Funktion, ebenso wie Kimmich u. Mitarbeiter, 1975. Daneben werden in der Literatur auch logarithmische Zuordnungen genannt (Tal u. Mitarbeiter, 1964¹⁶⁾; Stanley u. Williams, 1969¹⁶⁾; Neufeld u. Mitarbeiter, 1975).

- c) Bei dem in dieser Arbeit benutzten Meßgerät handelt es sich um einen vollautomatischen Photometer mit Photomultiplier (Lumac-Celltester) und wählbarer Signalfunktion (tatsächliche Lichtproduktion) oder Integralfunktion über 5 sec, 10 sec oder 40 sec nach Beginn der Lichtreaktion. Durch Druck des Startknopfes erscheint nach 2,4 sec der Nullwert in Digitalanzeige. Gleichfalls werden zu diesem Zeitpunkt 100 µl (Standardabweichung < 0,5 %) Luciferin-Luciferase-Mischung in das Probenvolumen injiziert. Nach einer Mischzeit von 1,2 sec beginnt die Aufzeichnung des Integrals, während bei Wahl der Signalfunktion Beginn der Lichtmessung mit der Reagenzinjektion zusammenfallen.

Zur ATP-Bestimmung in menschlicher Zahnplaque wurde grundsätzlich das 10 sec-Integral der Lichtkurve gewählt, um mit größtmöglicher Empfindlichkeit zu arbeiten (Kalbhen u. Koch, 1967; John, 1970), welche durch die gleichzeitige Erfassung des initialen Lichtgipfels nach einer Latenzzeit von 1,2 sec eine zusätzliche Steigerung erfährt. Die vom Hersteller angegebene Sensitivität beträgt 20 pg ATP in einem Probenvolumen von 1 - 500 µl, bei linearer Beziehung zwischen ATP-Konzentration und Integral der produzierten Lichtmenge über 4 - 5 Zehnerpotenzen. Demnach handelt es sich bei dem Celltester um ein hochempfindliches, einfach zu bedienendes, zeitsparendes ATP-Bestimmungsgerät, das bis zu 150 Proben in der Stunde reproduzierbar analysieren kann.

¹⁶⁾Aus Kimmich u. Mitarbeiter, 1975.

- 4.a) Trotz einer Optimierung des Meßverfahrens in Form des Lumac-Celltesters und weitgehender Beseitigung der Hintergrundlumineszenz durch Reinigung des Enzympräparates können Enzymaktivitätsverluste als Folge von falscher und zu langer Aufbewahrung des Leuchtkäferextraktes die Empfindlichkeit der Biolumineszenz wesentlich beeinflussen.

Das mehr oder weniger unvollständig gereinigte Luciferin-Luciferase-Extrakt aus Leuchtkäferschwänzen bleibt im aufgetauten Zustand bei Zimmertemperatur (25° C) für 36 Stunden stabil (Thore u. Mitarbeiter, 1975), allerdings nur, solange der in dieser Zeit eintretende Sättigungsverlust von Luciferase bezüglich Luciferin durch höhere Luciferinkonzentration ausgeglichen wird (Karl u. Holm-Hansen, 1976). Falls eine solche Maßnahme - wie auch in dieser Versuchsreihe - unterbleibt, ist grundsätzlich mit einem Aktivitätsverlust des Leuchtkäferextraktes bei Raumtemperatur zu rechnen (Kalbhen u. Koch, 1967). Sowohl Hammerstedt (1973) als auch Wettermark u. Mitarbeiter (1975) empfehlen deshalb unter diesen Bedingungen das Enzympräparat für den Zeitraum der Messung mit Rinderserumalbumin zu stabilisieren; in gleicher Weise wirkt Calciumphosphat (Kimmich u. Mitarbeiter, 1975).

Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4° C und Dunkelheit für 2 - 3 Tage ist nach Spiegel u. Tifft (1977) sowie Thore u. Mitarbeiter (1975) mit keinem Aktivitätsverlust verbunden, während andere Verfasser sogar nach 4 - 5 Tagen gleichstabiles Enzym vorfanden (Chapman u. Mitarbeiter, 1971; Wettermark u. Mitarbeiter, 1975). Die Diskrepanz von 2 - 3 Tagen liegt sicherlich in unterschiedlichen Enzym-Substrat-Präparationen begründet.

Das für die ATP-Bestimmungen in menschlicher Zahnplaque verwendete Lumit-Reagenz der Fa. Lumac bleibt in verdünnter Form bei 4° C für 1 - 2 Tage nahezu stabil, worauf

jedoch ein starker Aktivitätsverlust folgte (Spiegel u. Tifft, 1977). Überschüssiges Reagenz wurde deshalb nur in diesem Zeitraum wiederverwendet. Die bei Raumtemperatur auftretenden, unvermeidlichen Aktivitätsverluste waren nur geringfügig und konnten mit Hilfe eines internen Standards korrigiert werden.

b) Wie jede enzymatische Reaktion, so zeigt auch die von Luciferase mit Luciferin und ATP ein pH-Optimum, das mit 8,0 (Kimmich u. Mitarbeiter, 1975) oder 7,75 (Lundin u. Mitarbeiter, 1976) im schwach alkalischen Milieu liegt. Der Unterschied zwischen beiden Untersuchungen ist auch hier wieder auf verschiedene Enzymextrakte zurückzuführen.

5. Die größte Einschränkung bezüglich der Empfindlichkeit erfährt die Biolumineszenz zur ATP-Bestimmung in biologischem Material, wie z. B. einer Bakteriensuspension. Vor der eigentlichen Meßreaktion muß die Ausschleusung von intrazellulärem ATP mit Hilfe geeigneter Extraktionsmethoden erfolgen. Neben Verlusten von ATP aufgrund unvollständiger Extraktion (Beutler u. Mitarbeiter, 1974) oder Hydrolyse von extrahiertem ATP durch das Extraktionsmittel (Bagnara u. Finch, 1972), kommt es zu einer bis jetzt unerforscht gebliebenen Inhibition der Lumineszenz durch das Extraktionsverfahren. Absorption und Streuung emittierten Lichtes im Reaktionsansatz verringern zusätzlich die Lichtausbeute "Quench-Effekt"), und damit auch die Empfindlichkeit (Kalbhen u. Koch, 1967).

6.a) Während Hintergrundlumineszenz, verschiedene Meßverfahren, sowie präparatorisch bedingte Aktivitätsunterschiede des Luciferin-Luciferase-Extraktes durch externe Standardisierung kompensiert werden können und damit das eigentliche Meßergebnis unbeeinflusst lassen, sind Verluste von extrahiertem ATP und "Quench-Effekt" der Biolumineszenz durch das Extraktionsverfahren nur mit Hilfe der internen Standardisierung zu korrigieren. Da letztere Effekte

hauptsächlich bei ATP-Bestimmung im komplexen biologischen Material, wie z. B. einer Zahnplaque angetroffen werden, ist hier eine Verwendung von internem Standard zwingend, will man sich dem tatsächlichen ATP-Gehalt weitestgehend nähern. Das Verfahren der internen Standardisierung haben u.a. Kalbhen u. Koch (1967), John (1970), Hammerstedt (1973) und Conn u. Mitarbeiter (1975) bei ATP-Messungen angewendet.

- b) Zunächst wird jedem zweiten Extraktionsansatz eine gravimetrisch bestimmte ATP-Menge hinzugefügt und die Differenz zwischen gemessener Lichtmenge mit und ohne ATP-Standard ermittelt. Dividiert man die eingesetzte ATP-Menge durch die berechnete Differenz der Lichteinheiten, so erhält man den Korrekturfaktor "k", dessen Multiplikation mit der Lichtmenge ohne Standard die ATP-Konzentration im Meßansatz ergibt. Das folgende Schema verdeutlicht noch einmal die Zusammenhänge:

$$ATP^* = k \cdot RLU ; k = \frac{ATP-Standard}{RLU' - RLU}$$

ATP* = ATP-Konzentration im Meßansatz

RLU = "Relative Light Units" ohne ATP-Standard

RLU' = "Relative Light Units" mit ATP-Standard

- c) Wie aus dem obigen Formelschema ersichtlich ist, hängt die Richtigkeit des Korrekturfaktors "k" und damit auch das Meßergebnis davon ab, daß die pipettierte ATP-Standardsmenge mit der eingewogenen übereinstimmt. Voraussetzung dafür ist die Stabilität des verwendeten ATP-Standards im Verlauf einer längeren Meßreihe.

Während ATP in wässriger Lösung bei -20° C für Jahre konstant bleibt (Cheer u. Mitarbeiter, 1974), zerfällt es bei Raumtemperatur gelöst in Aqua bidest., pH 6,5 - 7,0, sehr schnell (Kalbhen u. Koch, 1967). Bei 1° C verliert der ATP-

Standard innerhalb von 4 Tagen kaum an Stabilität (Spiegel u. Tifft, 1977), so daß bei Aufbewahrung im Eisbad (Cheer u. Mitarbeiter, 1974) - wie in dieser Versuchsreihe - ATP-Verluste vernachlässigbar gering sind.

- V. Die ATP-Bestimmung mit Hilfe von Luciferin-Luciferase-Extrakten aus Leuchtkäferschwänzen hat sich heute aufgrund stark reduzierter Hintergrundlumineszenz, erhöhter Enzymstabilität, sowie verbesserter Meß- und Extraktionsmethoden zu einem Routineverfahren der analytischen Biochemie entwickelt. Seine Empfindlichkeit reicht heute aus - wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen -, Nanogramm-Schwankungen im ATP-Gehalt gemischter Bakterienpopulationen zu erfassen.

D. Material und Methoden

I. Plaqueentnahme

Die untersuchten Plaqueproben stammten von 15 willkürlich ausgewählten Patienten aus der ambulanten Abteilung für Zahn-, Mund- und Kieferchirurgie in Erlangen. Der Gebißzustand der 13 männlichen und 2 weiblichen Probanden im Alter zwischen 17 und 50 Jahren (Durchschnittsalter: 34 Jahre) war mit wenigen Ausnahmen sehr schlecht.

Vor der eigentlichen Entnahme wurde die vorhandene Plaquemenge grob geschätzt, da sowohl manometrische Messungen mit der Warburgapparatur als auch die weitere Aufbereitung der Plaque eine Mindestmenge von 20 mg Plaquefeuchtgewicht erforderten. Die Vorbereitung der Plaqueentnahme erfolgte nach der von Ranke u. Mitarbeiter (1967) sowie Gülzow u. Mardaus (1973) beschriebenen Methode.

Zunächst wurde alle sichtbare Plaque der Oberkiefer- und Unterkieferzahnreihe mit Wasserspray von "materia alba" und eingekleiteten Speiseresten befreit. Anschließend erfolgte Trockenlegung mit Hilfe von Speichelsauger und Watterollen, um eine Kontamination der untersuchten Plaque mit zellulären Speichelbestandteilen, wie Lymphozyten und Bakterien (Str. salivarius) zu vermeiden.

Die mit einem Luftbläser kurz angetrocknete Plaque wurde vorsichtig mit einem sterilen Heidemann- oder Hollenbackspatel entfernt und sofort in ein vorgewogenes Schliffdeckelgefäß überführt, um Gewichtsverluste von etwa 0,02 mg/min (Loesche u. Mitarbeiter, 1971) zu vermeiden. Eine Gewichtszunahme durch Fingerabdrücke am Wägegläschen wurde durch Hantieren mit Papierservietten verhindert.

Die Entnahme erfolgte zwischen 9 und 10 Uhr vormittags und

beanspruchte meist nicht mehr als 5 min. Je nach Proband konnten zwischen 20 und 54 mg (durchschnittlich 45 mg) supra-gingivale Plaque aus allen 4 Gebißquadranten gewonnen werden.

II. Plaqueaufbereitung

Etwa 15 min nach Entnahme der Plaque erfolgte die Bestimmung des Naßgewichts mit Hilfe einer Analysenwaage (Sartorius) auf Hundertstelmilligramm genau. Dazu wurde vom ermittelten Gefäßgewicht mit entnommener Plaque das vorgewogene Leergewicht subtrahiert.

Anschließend wurden die gewogenen Plaqueproben in physiologischer Kochsalzlösung (Pfrimmer) grob suspendiert, bis sich eine Konzentration von etwa 10 mg Plaquefeuchtgewicht/ml physiolog. NaCl-Lösung einstellte.

Die weitere Homogenisierung erfolgte mit Ultraschall bei niedrigster Leistung über 2 x 15 sec (Gawronski u. Mitarbeiter, 1973) mit einem Braun sonic 300s Ultraschalldispenser (Nadelschwingsonde: 4 mm Durchmesser). Die so erhaltene Plaquesuspension (≈ 10 mg/ml) wurde zur manometrischen Bestimmung der Säureproduktion im Warburgapparat verwendet (CO_2 -Ansatz).

Zur Messung von ATP mittels der Luciferin-Luciferase-Reaktion benötigt man kleinere Plaquemengen. Dazu wurde 1 ml der vorhergehenden Plaquesuspension (≈ 10 mg/ml) abpipetiert, mit 9 ml physiolog. Kochsalzlösung 1:10 verdünnt und erneut 1 x 15 sec mit Ultraschall behandelt. Die so erhaltene Plaquekonzentration war um 9/10 kleiner und betrug etwa 1 mg Plaquefeuchtgewicht/ml.

Die Bestimmung des ATP-Grundspiegels erfolgte mit 50 μl , 1:100 verdünnter und 15 sec mit Ultraschall homogenisierter Plaque-Suspension. Dazu wurde 1 ml aus der 1:10 verdünnten

Suspension entnommen und wiederum mit 9 ml physiolog. Kochsalzlösung versetzt, so daß die Endkonzentration an Plaque-naßgewicht pro ml 1/100 ($\approx 0,1$ mg/ml) der Ausgangskonzentration (≈ 10 mg/ml) betrug.

III. Anzucht der Str. mutans-Stämme T3/53 und 441

Beide Stämme wurden von F. Gehring aus Würzburg bezogen und auf Kulturplatten mit festem Thioglycolatnährmedium unter anaeroben Bedingungen gezüchtet.

Aus der Vorkultur wurden die isolierten Bakterienstämme um 12.00 Uhr mittags in Schraubdeckelflaschen mit Thioglycolat-Flüssigmedium überimpft und bis 10.00 Uhr vormittags des folgenden Tages (= 22 Stunden) bebrütet.

1000 ml Kulturflüssigkeit enthalten folgende Bestandteile:

Bacto-Casein	(Difco)	15,0 g
Yeast-Extrakt	(Difco)	5,0 g
NaCl p.a.	(Merck)	2,5 g
Glukose	(Merck)	10,0 g
L-Cystein	(Merck)	0,5 g
Na-Thioglycolat	(Difco)	0,5 g
Bacto-Agar	(Difco)	15,0 g

Die Bebrütung erfolgte in einem Kottermann-Brutschrank bei 37° C unter anaeroben Verhältnissen und ohne Bewegung der Kulturflüssigkeit, um eine zu niedrige Aldolaseaktivität zu vermeiden (Ranke u. Mitarbeiter, 1967).

IV. Gewinnung und Aufbereitung der Bakterienproben

Sie erfolgte entweder 22 oder 46 Stunden nach Beimpfung, wobei die Schraubdeckelflaschen mit 22 Stunden alter Bakterienkultur für weitere 24 Stunden bei 4° C und verschlossen

im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Nach Zentrifugation¹⁷⁾ der Bakterienflüssigkultur über 10 min bei Raumtemperatur (22° C) und 3000 U/min wurde die überstehende Kulturflüssigkeit dekantiert und durch physiolog. NaCl-Lösung ersetzt. Auf das Waschen der Bakterien folgte erneutes Zentrifugieren, Verwerfen des Überstandes und nochmaliges Auflösen des Bakterienrückstandes in physiolog. Kochsalzlösung, um anschließend steril zu filtrieren.

Dazu wurde die Bakteriensuspension in einer Millipore-Spritze (20 cm³) aufgezogen und T3/53 bzw. 441 auf Sartorius-Zellulosenitrat-Membranfilter (Porengröße: 0,3 µm) gesammelt. Anschließend wurde der Filter mit einer sterilen Pinzette entnommen und auf normales Filterpapier gelegt, um überschüssige Kochsalzlösung zu entfernen. Hierbei darf der Bakterienfilter nicht völlig austrocknen, da nach einer Untersuchung von Cheer u. Mitarbeiter (1974) der bakterielle ATP-Spiegel sich kaum verändert, solange der Filter feucht bleibt.

Zur Überführung der Bakterienpaste in ein vorgewogenes Schliffdeckelgefäß diente ein steriler Heidemannspatel. Die Naßgewichte der beiden *Str.mutans*-Stämme - in gleicher Weise wie bei den Plaqueproben ermittelt - lagen zwischen 31 und 59 mg (Mittelwert: 45 mg) und entsprachen somit dem durchschnittlich gewonnenen Plaquefeuchtgewicht (45 mg). Die weitere Aufbereitung und Verdünnung der *Str.mutans*-Proben erfolgte analog zu den Plaqueproben.

V. Extinktionsmessung

Sie erfolgte mit der 1:100 verdünnten Plaque- und Bakterien-suspension ($\approx 0,1$ mg/ml) in einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei $\lambda = 620$ nm. Diese Wellenlänge liegt in dem von Gawronski u. Mitarbeiter (1973) für Plaquesuspensionen angegebenen günstigen Bereich (550 - 650 nm), der eine geringe Lichtstreuung durch Plaquemikroorganismen und fehlende Absorption durch Fremdpartikel aufweist.

¹⁷⁾ Versuche mit *Azotobacter vinelandii* (Knowles u. Smith, 1970) und *Acanthamoeba castellanii* (Jantzen, 1974) ließen nur einen vernachlässigbar geringen Einfluß auf den bakteriellen ATP-Spiegel erkennen.

In dieser Versuchsreihe diente die nephelometrische Messung als Kontrolle für annähernd gleiche Bakterienzahl in den Warburgansätzen und galt somit als Index für richtige Naßgewichtsbestimmung und vollständig durchgeführte Homogenisierung von Plaque- und Str. mutans-Proben. Voraussetzung dafür ist allerdings eine enge Beziehung zwischen Naßgewicht und Trübung, die mit einem Korrelationskoeffizienten "r" von 0,92 sehr nahe bei 1,0 liegt (Gawronski u. Mitarbeiter, 1973). Ahrens u. Mitarbeiter (1964) fanden sogar eine noch höhere Korrelation ($r = 0,97$) zwischen Trockengewicht und Extinktion bei wahllos entnommener Plaque.

VI. Anaerobe Inkubation von Plaque- und Str. mutans-Proben im Warburgapparat

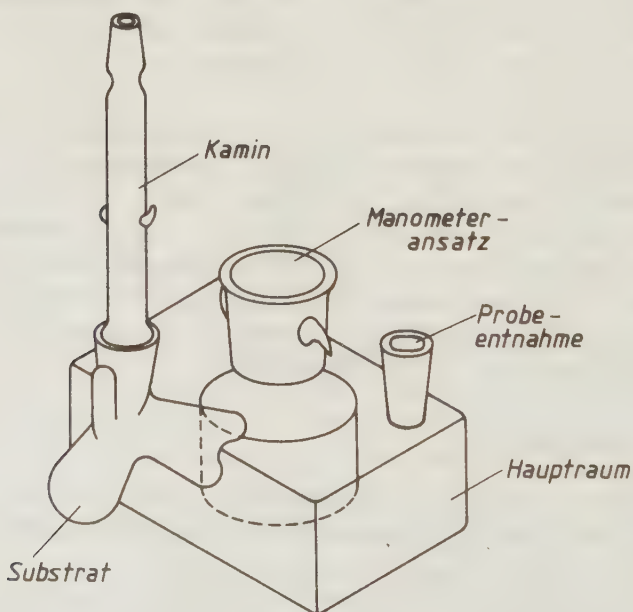


Abb.1: Zur ATP- und CO_2 -Messung in Plaque verwendetes Warburggefäß

Die unter II. und IV erhaltenen Plaque- und Bakteriensuspensionen wurden in einer handelsüblichen Schüttelwarburgapparatur (Fa. Braun/Melsungen) bei 37° C anaerob inkubiert.

1. Für jeden Versuch wurden insgesamt 3 Ansätze in ebenfalls drei der abgebildeten Warburggefäße (Abb. 1) erstellt.

a) Der CO_2 -Ansatz erfaßte die Säureproduktion und setzte sich aus folgenden Einzellösungen zusammen:

- Unverdünnte Plaque- oder Str. mutans-Suspension	$\approx 10 \text{ mg/ml}$	:	1,00 ml
- Bicarbonatpuffer	0,02 molar	:	1,25 ml
- Glukoselösung	0,04 molar	:	0,50 ml
			2,75 ml

b) Der ATP-Ansatz diente zur ATP-Bestimmung und enthielt folgende Bestandteile:

- 1:10 verdünnte Plaque- oder Str. mutans-Suspension	$\approx 1 \text{ mg/ml}$	:	1,00 ml
- Bicarbonatpuffer	0,02 molar	:	1,25 ml
- Glukoselösung	0,04 molar	:	0,50 ml
			2,75 ml

c) Der Thermo-Ansatz wurde als Leerwert mitgeführt, um die atmosphärischen Druck- und Temperaturschwankungen bei der manometrischen CO_2 -Bestimmung im CO_2 -Ansatz zu berücksichtigen. Er bestand aus:

- Aqua bidest.	:	2,75 ml
----------------	---	---------

2. Für CO_2 - und ATP-Ansatz wurde sowohl Plaque- bzw. Str. mutans-Suspension als auch Bicarbonatpuffer in den Hauptraum des Warburggefäßes (Abb. 1) pipettiert, während der Seitenschenkel zunächst die Substratlösung (Glukose) aufnahm. Nach Verschluß von Kamin- und Entnahmeöffnung er-

folgte der Anschluß an das mit Brodie-Lösung gefüllte Manometer und das Einbringen ins Wasserbad der Warburgapparatur. Exsikatorfett diente zur Abdichtung von Manometer- und Kaminansatz, sowie Entnahmestöpsel. Bei geöffnetem Kamin wurde 10 min mit einem Gasgemisch, bestehend aus 95 % Stickstoff und 5 % Kohlendioxid, begast und anschließend bei geschlossenem System der Inhalt des Seitenarmes im CO_2 - und ATP-Ansatz zugekippt, um die Reaktion zu starten. Während die Versuchszeit für die ATP-Bestimmung nach 190 - 205 min (inklusive Begasungszeit) abgeschlossen war, konnte bei Plaqueproben die CO_2 -Messung bis zu 300 min andauern.

VII. Die ATP-Bestimmung

ATP wurde mit Hilfe der schon ausführlich besprochenen Luciferin-Luciferase-Lumineszenz-Reaktion bestimmt. Zur Erfassung von bakteriellem ATP diente ein spezieller Biolumineszenz-Kit der Fa. Lumac, sowie der im vorausgehenden Kapitel beschriebene Lumac-Celltester (Modell 1030), ein auf diese Reagenzien abgestimmter, hochempfindlicher Photometer mit Photomultiplier.

1. Reagenzien

Der "Reagent Kit" setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

- Lumit: Gereinigtes Luciferin-Luciferase-Extrakt aus Leuchtkäfern, das in 5 ml Hepes-Puffer (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), pH 7,5, gelöst und mit einer pneumatisch betriebenen Spritzvorrichtung verbunden wird.
- NRB: Ein für die Extraktion von bakteriellem ATP speziell konzipiertes, sehr wirkungsvolles Extraktionsmittel (Med. Diss. Riedl), dessen chemische Zusammensetzung nicht bekannt ist.

Hepes-Puffer: Im Vergleich mit Tris-, Glycin- und Tes-Puffer für die Biolumineszenz besonders gut geeignet (John, 1970), da er interferierende und gleichzeitig inhibierende Effekte von PP_1 zu beseitigen vermag (Cunningham, 1969¹⁸).

ATP-Standard: Er gehörte nicht zum käuflichen "Reagent Kit" und wurde deshalb im Labor selbst hergestellt. Ein Fläschchen des in 5 ml-Portionen abgefüllten und tiefgefrorenen Standards wurde am Morgen eines jeden Versuchstages aufgetaut und für die Dauer der ATP-Messungen, ebenso wie Hepes-Puffer und NRB-Reagenz, im Eisbad aufbewahrt (Cheer u. Mitarbeiter, 1974).

2. Inbetriebnahme des Lumac-Celltesters

Vor der ersten Messung eines Versuchstages wurde das Meßgerät auf automatische Reagenzinjektion, Integration über 10 sec und höchste Empfindlichkeitsstufe eingestellt. Durch mehrmaliges Betätigen des Startknopfes erfolgte das Auffüllen der Injektorzuleitung mit Reagenz und gleichzeitig die Einstellung des Nullwertes.

3. Probenentnahme

Bevor die Reaktion in der Warburgapparatur durch Zukippen von Glukose gestartet wurde, erfolgte eine mehrmalige Probenentnahme aus der Plaque- oder Str. mutans-Suspension.

¹⁸) Aus John, 1970.

- (1) 50 μ l, 1:100 verdünnte und mit Ultraschall behandelte Plaque- bzw. Str. mutans-Suspension zur Bestimmung des Grundspiegels.
- (2) 5 μ l Ansatzvolumen aus dem Warburggefäß nach Zugabe von Bicarbonatpuffer (gesamtes Ansatzvolumen: 2,25 ml).
- (3) 5 μ l Ansatzvolumen nach einer Begasungszeit von 10 min (gesamtes Ansatzvolumen: 2,25 ml).

Bei Probenentnahme im Anschluß an die Begasungszeit und nach Substratzufuhr mußten anaerobe Bedingungen im ATP-Ansatz gewahrt bleiben. Dazu wurde vor Entnahme von Plaque- oder Bakteriensuspension der Gashahn leicht geöffnet, so daß während der Probenentnahme ein konstanter Gasdurchfluß den Zutritt von Luftsauerstoff verhinderte.

Nach Glukosezugabe wurde der ATP-Spiegel alle 15 min (Gadkari u. Stolp, 1975) ermittelt. Die Probenentnahme erfolgte, wie auch unter (1), (2) und (3), in vierfacher Ausführung, um mit interner Standardisierung ein Wertepaar für jeden Zeitpunkt der ATP-Bestimmung zu erhalten.

4. ATP-Meßansatz

Für jede ATP-Messung wurden 2 Meßansätze erstellt:

1. Ansatz ohne ATP-Standard, bestehend aus:
 - 50 μ l (Bestimmung des ATP-Grundspiegels) oder 5 μ l (alle weiteren Messungen) Plaque- oder Bakteriensuspension
 - 50 μ l NRB
 - 100 μ l Lumit
2. Ansatz wie 1. Ansatz, aber zusätzlich:
 - 100 μ l ATP-Standard (10 ng/ml)

Die Extraktionszeit betrug in beiden Ansätzen 60 sec

nach Zugabe von NRB. Das anschließende Meßintervall - durch Injektion von Lumit gestartet - dauerte 10 sec und lieferte als Endwert das Integral der Lumineszenzreaktion als relative Lichteinheiten (engl.: Relative Light Units", abgekürzt: RLU) in Digitalanzeige.

5. Berechnung der ATP-Menge pro mg Plaque- bzw. Str. mutans-Feuchtgewicht

Aus der Differenz der relativen Lichteinheiten von Ansatz 2 = RLU' minus Ansatz 1 = RLU und der eingesetzten Menge an ATP-Standard errechnet sich der Faktor "k" (siehe vorangehendes Kapitel).

$$k = \frac{1 \text{ ng ATP-Standard (100 } \mu\text{l)}}{\text{RLU}' - \text{RLU}}$$

Multiplikation von "k" mit RLU ergibt die ATP-Menge im Lumineszenzansatz 1, die wiederum von den 50 μl oder 5 μl Plaque- bzw. Str. mutans-Suspension extrahiert worden ist. Mit Hilfe eines Verdünnungsfaktors kann dann auf den ATP-Gehalt/mg Plaque- bzw. Str. mutans-Naßgewicht zurückgerechnet werden.

VIII. Bestimmung und Berechnung der Säureproduktion

Sie erfolgte manometrisch über die Entstehung von CO_2 nach Reaktion von H^+ mit Pufferbicarbonationen. Der Produktion von CO_2 liegt folgende Reaktionsgleichung zugrunde:



Jedes entstehende Wasserstoffion verschiebt das Reaktionsgleichgewicht nach rechts und führt zur quantitativen CO_2 -Produktion. Diese Mol-zu-Mol-Beziehung wird allerdings nur dann aufrechterhalten, wenn die Kapazität des Bicarbonatpuffers nicht überschritten wird. Bei ausreichend hoher

Pufferkonzentration und Puffermenge (0,04 molar; 1,25 ml) - wie in dieser Versuchsreihe - ist keine Erschöpfung der Pufferkapazität zu befürchten.

Der im geschlossenen Warburggefäß ansteigende CO_2 -Druck wurde alle 15 min nach Glukosezugabe anhand der Brodie-Säule im Manometer bestimmt. Unter Berücksichtigung der atmosphärischen Druckschwankungen im Thermoansatz, sowie der für CO_2 - und Thermoansatz zu bestimmenden Gefäßkonstanten k_{CO_2} und k_T , läßt sich der CO_2 -Druck in $\mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque-}$ bzw. Str. mutans-Feuchtgewicht nach folgendem Gleichungssystem umrechnen:

$$(1) \mu\text{l CO}_2/\text{Ansatz} = V_{\text{CO}_2}[\mu\text{l}] - V_T[\mu\text{l}]$$

$$(2) V_{\text{CO}_2} = P_{\text{CO}_2} \cdot k_{\text{CO}_2}; \quad V_T = P_T \cdot k_T$$

$$(3) k_{\text{CO}_2} = \frac{V_{\text{gCO}_2} \cdot 0,88 + 1,4175}{10} \quad ; \quad k_T = \frac{V_{\text{gT}} \cdot 0,88 + 1,4175}{10}$$

$$(4) V_{\text{gCO}_2} = V_{\text{Gefäß}} + V_{\text{Manometer}} - 2,5; \quad V_{\text{gT}} = V_{\text{Gefäß}} + V_{\text{Manometer}} - 2,5$$

Es bedeuten:

V_{CO_2} und V_T : CO_2 -Volumina in μl im CO_2 - bzw. im Thermoansatz

P_{CO_2} und P_T : Manometrisch bestimmter CO_2 -Druck im CO_2 - bzw. im Thermoansatz.

k_{CO_2} und k_T : Gefäßkonstanten für CO_2 - bzw. Thermoansatz.

V_{gCO_2} und V_{gT} : Summe aus Gefäß- und Manometervolumen minus 2,5 ml für CO_2 - bzw. Thermoansatz.

Lösung der Gleichungen (1) - (4) ergibt die im CO_2 -Ansatz entstandene Kohlendioxidmenge in μl . Dividiert man durch die im Ansatzvolumen enthaltene Plaque- oder Str. mutans-

Menge (≈ 10 mg), so erhält man die von 1 mg Plaque bzw. Str. mutans gebildeten $\mu\text{l CO}_2$. Erneute Division mit 22,4 (Molvolumen) gibt die μMol an produziertem CO_2 an, die nach der Bicarbonatpuffergleichung mit den μMol an erzeugten H^+ -Ionen identisch sind.

IX. Fluoreszenzmikroskopie

500 μl der 1:100 verdünnten Plaque- oder Str. mutans-Suspension wurden mit 40 μl einer 0,1 %igen (20 mg/200 ml) Acridin-orangelösung versetzt. Ein Tropfen dieser angefärbten Suspension diente zur Anfertigung eines Deckglaspräparates, welches anschließend bei 1000facher Vergrößerung im Fluoreszenzauflicht eines Zeiss-Standardmikroskops (Fluoreszenzauflichtkondensor IV FI mit Hg-Hochdrucklampe) betrachtet wurde. Mit Hilfe eines Meßokulars wurde die Anzahl rot und grün leuchtender Bakterien pro Gesichtsfeld ermittelt, wobei rot fluoreszierende Keime als abgestorben und grün leuchtende Bakterien als lebend angesehen wurden (Strugger, 1940).

Nach der Auszählung von 20 Gesichtsfeldern pro Präparat wurde Mittelwert und Standardabweichung für rote und grüne Bakterien bestimmt und daraus das prozentuale Verhältnis lebender zu toter Mikroorganismen in der untersuchten Plaque- oder Str. mutans-Probe berechnet.

X. Vorrätige Reagenzien

1. ATP-Standard (10 ng/ml): Jeweils 5 ml mit einer Konzentration von 10 ng/ml wurden in kleine Fläschchen abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Dazu mußte 1 mg Adenosin 5'-triphosphat- Na_2 -Salz (Seva Feinbiochemica, Heidelberg) mit einem Molekulargewicht von 605,2 und einer ADP + ATP-Konzentration von ca. 1 % in 1 l Aqua bidest. gelöst werden. Aus dieser Lösung wurden 2 ml (2 μg) entnommen und mit 198 ml Aqua bidest. auf eine Endkonzentration von 10 ng ATP/ml verdünnt. Diese Menge an ATP-Standardlösung (200 ml) reichte aus, um 40 5 ml-Portionen abzufüllen und einzufrieren.

Mit dem Inhalt eines Fläschchens konnten 50 ($50 \times 100 \mu\text{l}$) ATP-Messungen durchgeführt werden, mehr als die erforderliche Anzahl pro Versuchstag.

2. Glukoselösung (0,04 molar): 1,585 g D (+) Glukose-Monohydrat (Merk,), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ wurden in 200 ml Aqua bidest. gelöst und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.
3. HCO_3^- -Puffer (0,02 molar): 336 mg wurden in 200 ml Aqua bidest. gelöst und ebenfalls im Kühlschrank gelagert.

XI. Reinigung der Gefäße

Bakteriell verschmutzte Glasküvetten (ATP-Messung) und Warburggefäße erhöhen die gemessenen ATP- und CO_2 -Werte. Deshalb mußten umfangreiche Reinigungsprozeduren durchgeführt werden.

1. Glasküvetten: Nach gründlicher Reinigung in der Spülmaschine (Miele Automatic G-19, Lavabor) wurden sie mehrmals mit Extran und heißem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden sie mit Seradest S-10 nachgespült und mit Heißluft (Kottermann-Lufttrockner) getrocknet.
2. Warburggefäße (Abb. 1): Sie wurden zunächst in Tetrachlorkohlenstoff zur Beseitigung von Eksikkatorfettrückständen gelegt und daraufhin per Hand wie die Glasküvetten gereinigt.

E. Ergebnisse und Diskussion

I. ATP-Standardkurve

Das 10-sec-Integral der produzierten Lichtmenge ist der im Meßansatz vorhandenen ATP-Konzentration direkt proportional und wird in relativen Lichteinheiten (RLU = "Relative Light Units") am Ende der Integrationszeit wiedergegeben. Bezüglich der Linearität der ATP-Standardkurve innerhalb des Meßbereichs dieser Versuchsreihe (20 ng - 2000 ng ATP/mg Plaque bzw. Str. mutans = 40 pg - 4000 pg ATP/Meßansatz) sei auf Med. Diss. Maurer (1981) verwiesen.

II. ATP-Spiegel und CO₂-Produktion in 15 wahllos entnommenen Plaqueproben

1. Der ATP-Spiegel

a) Der Grundspiegel

Abb. 2 zeigt die Häufigkeitsverteilung der in 15 Plaqueproben gefundenen ATP-Konzentrationen in ng ATP/mg Plaque-naßgewicht vor Inkubation in der Warburgapparatur. Die gemessenen ATP-Spiegel streuen um einen Mittelwert $\bar{x} = 108,13$ ng mit einer Standardabweichung $s = 48,12$ ng, wobei der Bereich $\bar{x} \pm s$ (schraffiert gezeichnete Fläche) 70 % der Gesamtfläche einnimmt.

Der durchschnittliche ATP-pool¹⁹⁾ in willkürlich gewonnener Plaque liegt um 64 ng ATP/mg Feuchtgewicht niedriger als die unterste Grenze der bei Holms u. Mitarbeiter (1972) aufgelisteten ATP-Spiegel von 11 Verfassern und 6 verschiedenen Mikroorganismen. Dieser kleinste Wert von 172 ng ATP/mg Bakteriennaßgewicht wurde u.a. von Forrest (1965) am Anfang der stationären Phase von Str. faecalis und von Knowles u. Smith (1970) als anaerober, stationärer Spiegel von Azotobacter vinelandii gefunden.

¹⁹⁾ Engl. für intrazelluläre ATP-Konzentration = ATP-Spiegel.

Niedrigere ATP-Konzentrationen von ca. 100 ng ATP/mg Naßgewicht konnten nur nach längerer Hungerphase (engl.: "starvation") beobachtet werden (Forrest, 1965; Mathis u. Brown, 1976), so daß die in wahllos entnommener, reifer Plaque angetroffenen Verhältnisse weitgehend mit denen einer ruhenden und ausgehungerten Bakterienkultur zu vergleichen sind.

Die beobachtete Variationsbreite des ATP-Spiegels innerhalb der 15 untersuchten Plaqueproben mit einer Standardabweichung von 48,12 ng ATP/mg Plaquesaßgewicht verwundert nicht, handelt es sich doch bei willkürlich gewonnener Plaque um eine nach Alter, Lokalisation und Substratangebot ganz unterschiedlich zusammengesetzte gemischte Bakterienpopulation. Die bis zu 24 von Hemmens u. Mitarbeiter (1946) aus Plaque isolierten Bakterien unterscheiden sich nicht nur in ihren Stoffwechselleistungen, sondern auch in ihrer Zellgröße. Beides, sowohl Zellmetabolismus (Thore u. Mitarbeiter, 1975) als auch Zellvolumen (Stouthamer, 1973), stehen in enger Korrelation zum zellulären ATP-Spiegel. Angesichts der heterogenen, bakteriellen Flora verschiedener Plaques und der geringen Probenzahl erscheint die ermittelte Standardabweichung nicht zu hoch, zumal 70 % der Fläche aller Gruppensäulen im Histogramm den Bereich $\bar{x} \pm s$ einnimmt.

b) "ATP-pool-level"²⁰⁾ nach Inkubation im Warburggefäß

(1) Einfluß des Bicarbonatpuffers

Wie in Abb. 3 zu erkennen ist, fällt der ATP-Spiegel nach Pufferzugabe um einen Betrag von 33 ng ATP/mg Plaque. Gleiches Verhalten wie 1.10 zeigt Plaqueprobe 1.13 mit einer Differenz von 10 ng ATP/mg Plaque zwischen Grund- und " HCO_3^- -Spiegel", während die übrigen Plaques zum Teil überhaupt nicht (1.4; 1.11;

1.12; 1.15), zum Teil mit einer Erhöhung des ATP-pool um durchschnittlich 38 ng ATP/mg Plaque reagieren (1.1; 1.2; 1.3; 1.5; 1.6; 1.7; 1.8; 1.9; 1.14; Abb. 4 u. 5).

Derartige Schwankungen des ATP-Spiegels als Folge von pH-Änderungen durch Pufferwechsel wurden bereits von Forrest u. Walker (1965 a) sowie Cole u. Mitarbeiter (1967) an *Str. faecalis* bzw. *Escherichia coli* beobachtet.

Bei einer willkürlich gewonnenen Zahnplaque findet man je nach Alter, Lokalisation und Zeitpunkt der letzten Substratzufuhr (Nahrungsaufnahme durch den Probanden) ganz unterschiedliche pH-Verhältnisse vor, die sowohl dem pH-Wert des zugefügten Bicarbonatpuffers entsprechen als auch von ihm abweichen können. Im letzteren Fall erfährt das entweder saure oder alkalische Plaquemilieu durch Pufferzugabe eine Neutralisation, die wiederum eine Erhöhung oder Senkung der Stoffwechselaktivität hervorruft. Eine Veränderung von ATP-Produktion oder ATP-Verbrauch kann je nach der ursprünglichen Stoffwechsellage zu einem Abfall oder Anstieg des bakteriellen ATP-Spiegels führen. Die Größe des Änderungsbetrages richtet sich hierbei nach der Höhe der pH-Verschiebung, die wiederum vom pH-Wert des Puffers und dem ursprünglichen pH-Milieu in der Plaqueprobe abhängig ist.

(2) Einfluß der Begasung

Mit Hilfe eines Gasgemisches, bestehend aus 95 % Stickstoff und 5 % Kohlendioxid, werden anaerobe Bedingungen in den Warburgansätzen hergestellt.

8 von 15 Plaqueproben (1.1; 1.3; 1.4; 1.7; 1.8; 1.9; 1.10; 1.11) zeigen einen Anstieg des ATP-Spiegels

nach 10minütiger Begasungszeit, der in der Größenordnung von durchschnittlich 26,5 ng ATP/mg Plaque liegt (Abb. 3 u. 4), während bei 4 Proben (1.2; 1.12; 1.13; 1.15) der "ATP-pool-level" nahezu konstant bleibt. Bei den restlichen Probanden verringert sich der ATP-Gehalt nach Einstellen auf anaerobe Bedingungen um 16 - 18 ng ATP/mg Plaque (1.6 u. 1.14), in einem Fall (Abb. 10: 1.5) sogar um 78 ng ATP/mg Plaque. Anstieg und Abfall der ATP-Konzentration erfolgt um den gleichen durchschnittlichen Betrag von ca. 25 % des " HCO_3^- -Spiegels".

Eine Erklärung für die unterschiedliche Reaktion des ATP-pool auf anaerobe Begasung liefert erneut die sehr variable, bakterielle Zusammensetzung der Plaque. Während in jüngeren Zahnbelägen Aerobier und fakultative Anaerobier vorherrschen, sind in älterer, reiferer Plaque mehr obligat anaerobe Keime anzutreffen (s.S. 7 - 8).

Besteht nun eine wahllos entnommene Plaqueprobe aus einer Mehrzahl von fakultativ anaeroben Mikroorganismen, so wird durch Einstellen auf einheitlich anaerobe Bedingungen der gesamte Energiestoffwechsel dieser Plaqueprobe gesenkt. Dies führt bei konstant gebliebenem ATP-Verbrauch zu einer Senkung des ATP-pool (Abb. 5 u. 10).

Sind obligat anaerobe Keime in der Überzahl, führt Begasung mit 95 % N_2 und 5 % CO_2 zu einer Optimierung der anaeroben ATP-Produktion, die eine gleichzeitig verringerte ATP-Bildung bei den fakultativ anaeroben und aeroben Bakterien übertrifft. Bei konstantem "ATP-output"²¹⁾ erhöht sich der ATP-Spiegel.

Finden sich fakultative und obligate Anaerobier im gleichen prozentualen Verhältnis innerhalb einer

²¹⁾ Engl. für ATP-Verbrauch.

Plaueprobe, heben sich die beschriebenen Reaktionen auf den ATP-pool gegenseitig auf und der ATP-Spiegel bleibt konstant.

Die in der Literatur berichteten Änderungen des ATP-Gehaltes/mg Bakteriennaßgewicht nach Umschalten von aeroben auf anaerobe Kulturbedingungen schwanken zwischen 36 % (Cole u. Mitarbeiter, 1967: *Escherichia coli*), 50 % (Strange u. Mitarbeiter, 1963: *Aerobacter aerogenes*) und 75 % (Knowles u. Smith, 1970: *Azotobacter vinelandii*) Abfall des ATP-Spiegels bezüglich des Ausgangswertes. Diese mit durchschnittlich 50 % angegebene Änderung des ATP-pool in Bakterienreinkulturen entspricht dem mit ca. 25 % Abfall und ca. 25 % Anstieg des ATP-Spiegels abgegrenzten Variationsbereich einer gemischten Bakterienpopulation, wie der Zahnplaque.

c) ATP-Spiegel nach Glukosezufuhr

Abb. 3 - 5 u. 10 zeigen die Reaktion des "ATP-pool-level" nach Zufuhr von 20 μ Mol Glukose. Anhand des Kurvenverlaufs von 15 Plaueproben nach Glukosezugabe können 2 fast gleichgroße Gruppen unterschieden werden.

Typ I (Abb. 3, 5, 10) wird durch die Plaueproben 1.4; 1.5; 1.6; 1.9; 1.10; 1.12; 1.13 und 1.14 repräsentiert. Nach dem Zukippen von Glukose erfolgt innerhalb der ersten 15 min ein maximaler, linearer Anstieg des ATP-Spiegels, der zwischen 17 und 100 ng ATP/mg Plaue liegt und eine mittlere Größe von 45 ng ATP/mg Plaue einnimmt. Der ATP-Gipfel wird bei 7 von 8 Probanden bereits nach 15 min, in einem Fall (Abb. 5: 1.6) erst nach 30 min erreicht.

Abb. 4 verdeutlicht das Reaktionsgeschehen vom Typ II der untersuchten Plaueproben (1.1; 1.2; 1.3; 1.7; 1.8; 1.11; 1.15). Glukosezugabe läßt den zellulären ATP-Gehalt zu-

nächst innerhalb von 15 min um durchschnittlich 50 ng ATP/mg Plaque absinken. Anschließend erfolgt maximaler, linearer Anstieg in einem Größenbereich von 12 - 120 ng ATP/mg Plaque x 15 min, mit einer mittleren Erhöhung des ATP-pool um 50 ng ATP/mg Plaque. Nach initialem Absinken des ATP-Spiegels wird in 5 von 7 Fällen nach 15 min, bei 2 Probanden erst nach 30 min der ATP-Gipfel erreicht.

Im weiteren Kurvenverlauf ähneln sich alle 15 Plaqueproben. 30 - 45 min nachdem der "ATP-pool-level" sein Maximum durchlaufen hat, pendelt er sich trotz fortgesetzter ATP-Produktion auf einen neuen, konstanten Wert ein, der dem vor Glukosezugabe in der jeweiligen Plaqueprobe bestimmten ATP-Spiegel annähernd entspricht (Abb. 3 - 5, 10).

Typ I und II der Plaque-ATP-Kurven unterscheiden sich grundsätzlich nur in ihrem initialen Reaktionsverhalten nach Glukosezugabe, während alle anderen Parameter, wie lineare, 15minütige Anstiegsgeschwindigkeit des "ATP-pool-level", sowie Zeitbedarf bis zum Erreichen von Maximal- und Ausgangswert näherungsweise übereinstimmen bzw. in gleicher Weise variieren.

Das Verhalten des ATP-Spiegels nach alleiniger Zufuhr einer katobolen Energiequelle wurde bis heute nur an einzelnen Bakterienstämmen verfolgt, die unter Wegfall eines essentiellen Wachstumsfaktors (z. B. Stickstoffquelle) nicht mehr teilungsfähig waren. Alle unter diesen Bedingungen des endogenen Metabolismus untersuchten Mikroorganismen beantworteten eine Substratzufuhr im Überschuß mit einer vorübergehenden Erhöhung des ATP-Spiegels, wobei Umfang und Dauer des jeweiligen ATP-Ausschlages je nach Keimart und Verfasser variierten.

Während Forrest (1965) in gewaschenen Bakteriensuspensionen von *Str. faecalis* einen 10fachen Anstieg des ATP-pool von 80 ng auf 800 ng ATP/mg Naßgewicht beobachten konnte,

dessen Maximum nach 70 min erreicht wurde, fanden Mota u. Guerra (1969) mit dem gleichen Bakterienstamm nur eine 6fache Erhöhung, die ihren Gipfelpunkt bereits nach 44 min durchlaufen hatte.

Neuere Literaturangaben (Gadkari u. Stolp, 1975: *Bdellovibrio bacteriovorus*; Mathis u. Brown, 1976: *Escherichia coli*) verweisen auf einen 4- bis 5fachen "ATP-pool-level" nach Substratzufuhr und Wachstumsstop; der Anstieg des ATP-Spiegels bis zum Maximum benötigt in beiden Fällen nur 15 min und verläuft linear. Anschließend erfolgt ein 45minütiger Abfall des "ATP-pool-level" auf einen neuen, konstanten ATP-Gehalt/mg Bakterien (Gadkari u. Stolp, 1975).

Vergleicht man diese neueren Literaturhinweise mit den Ergebnissen von 15 Plaqueproben, so fällt auf, daß trotz gleichem Zeitbedarf für Erreichen von Maximal- und Ausgangswert des ATP-Spiegels doch erhebliche Unterschiede bezüglich der Höhe des ATP-Ausschlages zwischen isolierten Einzelstämmen und einer gemischten Bakterienpopulation bestehen. Berechnet man das durchschnittliche Anstiegsvermögen der 15 Plaqueproben bezogen auf den jeweiligen anaeroben Ausgangsspiegel, so erhält man eine mittlere Erhöhung des ATP-pool um den Faktor 0,37 innerhalb von 15 min, während die von Gadkari u. Stolp sowie Mathis u. Brown untersuchten Bakterienstämme im gleichen Zeitraum einen 4- bis 5fachen Anstieg des ATP-Spiegels aufweisen.

Nur Dietzler u. Mitarbeiter (1973) berichten von einem 0,5fachen Anstieg des zellulären ATP-Gehaltes in *Escherichia coli* nach Erschöpfung der Stickstoffquelle und gleichzeitigem Substratüberschuß; sie kommen damit dem Verhalten einer durchschnittlichen Plaqueprobe nach Glukosezufuhr am nächsten.

Eine genaue Interpretation der in Zahnplaque ablaufenden Regulationsvorgänge, wie auch die hohe Variationsbreite

der initialen Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-Spiegels innerhalb der Plaqueproben und der bereits in der Literatur untersuchten Stämme ist nur unter Berücksichtigung der anaeroben Glykolyserate möglich.

2. Die CO_2 -Produktion

Die unter den beschriebenen Versuchsbedingungen in den Warburgansätzen ablaufende, anaerobe Glykolyse führt zur Bildung von 2 Mol Lactat, 2 Mol H^+ -Ionen und 2 - 3 Mol ATP (Baldwin, 1970; Holms u. Mitarbeiter, 1972), jeweils pro Mol abgebauter Glukose. Jedes entstehende Proton reagiert mit einem Bicarbonatanion nach der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Puffergleichung zu einem CO_2 -Molekül, so daß die pro Zeit- und Masseneinheit produzierten $\mu\text{Mol CO}_2$ der anaeroben Glykolyserate im CO_2 -Ansatz entsprechen. Für vergleichende Untersuchungen können auch die gebildeten $\mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque} \times \text{min}$ verwendet werden, da sie sich nur um den Faktor 22,4 (Molvolumen) von den erzeugten $\mu\text{Mol CO}_2$ unterscheiden.

Die in allen Plaqueproben gefundene CO_2 -Produktionsrate in $\mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaquenaßgewicht} \times \text{min}$ ist weitgehend konstant (Abb. 3 - 5, 10) und nähert sich 270 - 285 min nach Glukosezugabe asymptotisch dem Nullwert, bei einer Endkonzentration von ca. 60 $\mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque}$ im CO_2 -Ansatz (Abb. 12). Dies entspricht einer durchschnittlichen, linearen CO_2 -Bildung von 0,22 $\mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque} \times \text{min}$, welche sich aus den Einzelmessungen von 15 wahllos entnommenen Plaques bestimmen läßt (Tab. 1, Spalte 2).

Abb. 6 zeigt die Häufigkeitsverteilung der ermittelten Meßwerte, die mit einer Standardabweichung $s = 0,08 \mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque} \times \text{min}$ um den errechneten Mittelwert $\bar{x} = 0,22 \mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque} \times \text{min}$ streuen, wobei 78 % (schraffiert gezeichnet) der Gesamtfläche den Bereich $\bar{x} \pm s$ einnimmt.

Dieses Ergebnis läßt auf eine bemerkenswerte Konstanz der in Plaque vorhandenen Säure-, und damit auch ATP-Produktionsrate schließen.

3. ATP-Spiegel und CO_2 -Produktion

a) Die Konstanten K^* und K

Vergleicht man Spalte 2 und 3 von Tab. 1, so fällt auf, daß einer relativ konstanten CO_2 -Bildung/mg Plaque x min (Spalte 2) eine sehr variable, initiale Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-pool in ng ATP/mg Plaque x min (Spalte 3) gegenübersteht. Der letztere Wert entspricht der nahezu linearen, 15minutigen Steigung der ATP-Kurve nach Glukosezugabe, die bei Typ I direkt im Anschluß an die Glukosezufuhr, bei Typ II erst nach Abfall des ATP-Spiegels erfolgte.

Dividiert man die so erhaltene Anstiegsgeschwindigkeit von 15 Plaqueproben durch die jeweilige CO_2 -Produktionsrate und rechnet man die ermittelten ng ATP/ μl CO_2 in Mol ATP/Mol H^+ um, so ergeben sich die in der Spalte 4 und 5, Tab. 1, aufgelisteten Konstanten K^* und K .

Sie geben an, wieviel ng ATP bzw. Mol ATP pro μl CO_2 bzw. Mol H^+ -Ionen als Nettogewinn in den ATP-pool einfließen, oder anders ausgedrückt, wieviel Netto-Mol ATP bei der pro Mol H^+ gebildeten Bruttomenge für eine Erhöhung des ATP-Spiegels nach Glukosezugabe übrig bleiben. Im Vergleich mit der theoretisch über anaerobe Glykolyse erzeugten ATP-Menge ist der Nettoeinfluß sehr viel kleiner als die Bruttoproduktion.

Nach Baldwin (1970) und Holms u. Mitarbeiter (1972) können gemischte Bakterienpopulationen 2,5 Mol ATP/Mol Glukose, das sind 1,25 Mol ATP/Mol H^+ , bilden, da 2 Mol H^+ -Ionen/Mol Glukose entstehen. Aus Tab. 1, Spalte 5, folgt

somit, daß von 1,25 Mol an katabol erzeugtem ATP im Durchschnitt nur $0,8 \times 10^{-3}$ Mol ATP als Nettogewinn im ATP-pool von 15 Plaqueproben erscheinen, das sind rund 1500 mal weniger als die tatsächlich produzierte Menge.

Die Differenz von $1,25 - 0,8 \times 10^{-3} = 1,242$ Mol fällt dem gleichzeitig ablaufenden ATP-Verbrauch zum Opfer, der somit 99,936 % der ATP-Produktion einnimmt.

b) Die initiale Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-Spiegels

Wie Tab. 1, Spalte 5, aufzeigt, variiert K zwischen $0,1 \times 10^{-3}$ und $2,1 \times 10^{-3}$ Mol ATP/Mol H^+ , also um den Faktor 21. Dementsprechend ändert sich auch die initiale Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-pool innerhalb der untersuchten Plaqueproben (Tab. 1, Spalte 3). Dies deutet auf eine unmittelbare Beziehung zwischen K und dem Anstieg der 15 ATP-Kurven hin.

Der in Plaque wie auch in jeder anderen Baktieriensuspension beobachtete Anstieg des ATP-Spiegels verkörpert die Summe aus ATP-Bildungsgeschwindigkeit und Höhe des ATP-Verbrauchs. Beide Parameter vereinigen sich in der Konstanten K, wobei die Differenz von $1,25 - K$ den für die jeweilige Plaquesuspension spezifischen ATP-Verbrauch bezeichnet. Je größer K, desto kleiner wird die Differenz und umso niedriger ist der "ATP-output".

Eine annähernd konstante ATP-Produktionsrate (Abb. 3 - 5, 6, 10; Tab. 1, Spalte 2), gekoppelt mit gleichem ATP-Verbrauch, würde zu fast identischen, initialen Anstiegsgeschwindigkeiten des ATP-pool innerhalb der 15 Plaqueproben führen. Die trotz konstanter CO_2 -Bildung beobachteten Variationsmöglichkeiten im Anstieg des ATP-Spiegels (Tab. 1, Spalte 3) sind somit auf den sich in unterschiedlichen K-Werten widerspiegelnden ATP-Verbrauch zurückzuführen.

Eine Erklärung für die zum Teil stark abweichenden K-Werte

liefert die spätere Auswertung der Str. mutans-Kurven, die K eindeutig als eine Bakterienkonstante definieren. Da eine gemischte Bakterienpopulation wie die Plaque in ihrer bakteriellen Zusammensetzung je nach Alter, Lokalisation und Proband starke Unterschiede aufweist, wird auch die jeweilige Summationskonstante K entsprechend variieren. Die in einer bestimmten Plaqueprobe gefundene Größe K (Tab. 1, Spalte 5) setzt sich demnach aus mehreren, unterschiedlichen Einzelkonstanten zusammen. Auf den zum Teil sehr variablen ATP-Verbrauch einzelner Bakterien haben Stouthamer u. Bettenhausen (1973), Stouthamer (1973) und Forrest (1965) hingewiesen.

c) Die Gegenregulation

Doch nicht nur die initiale Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-Spiegels nach Glukosezufuhr, sondern auch dessen erreichte Maximalhöhe korreliert mit dem plaquespezifischen ATP-Verbrauch. In 12 von 15 Fällen wird das ATP-Maximum bei konstantem Anstieg des ATP-pool nach 15 min durchlaufen, so daß hohe Steigung in diesem Zeitraum zu gleichfalls hohem ATP-Gipfel führt und umgekehrt.

Bis zum Zeitpunkt der regulativen Maßnahme erfolgt linearer Anstieg der ATP-Kurve, bei gleichzeitig konstanter ATP-Produktionsrate (Abb 3 - 5, 10) und folglich ebenfalls konstant hohem ATP-Verbrauch. Nach 15 min bzw. unmittelbar vorher setzt die Gegenregulation durch blitzartige Änderung des "ATP-output" ein. Der vermehrt ablaufende ATP-Verbrauch holt die weiterhin konstant gebliebene ATP-Produktion (Abb. 3 - 5, 10) in wenigen Minuten ein und übertrifft sie schließlich, so daß bei unveränderter Glykolyserate der Spiegel wieder absinkt. Der Abfall des ATP-Spiegels erfolgt exponentiell und nähert sich nach 30 - 45 min einem konstanten Endwert.

Der Zeitpunkt der einsetzenden Gegenregulation scheint nicht mit der Höhe der zellulären ATP-Konzentration zu

korrelieren. Würde ein derartiger Zusammenhang bestehen, könnte auch der am steilsten ansteigende ATP-Spiegel kein höheres Maximum erreichen als die Plaqueprobe mit dem größten ATP-Verbrauch und folglich der geringsten Anstiegsgeschwindigkeit. Es handelt sich vielmehr um einen Regulationsvorgang mit konstanter Verzögerungszeit, welche z. B. durch enzyminduktive Vorgänge aufgebraucht werden könnte.

Die Geschwindigkeit der gegenregulatorischen Maßnahme ist erstaunlich hoch und erklärt sich aus dem im Vergleich zur ATP-Produktion hohen ATP-Verbrauch. Minimale Änderungen des "ATP-output" genügen, um die ATP-Bildungsgeschwindigkeit einzuholen.

d) Der Abfall des ATP-Spiegels

Der weitere, exponentielle Kurvenverlauf im abfallenden Teil des ATP-pool läßt auf ein vom bakteriellen ATP-Spiegel kontrolliertes Regulationsgeschehen schließen. Je höher der im Maximum erreichte "ATP-pool-level" ist, umso steiler und schneller erfolgt der Abfall, der nach 30 - 45 min beendet ist (Abb. 3 - 5,10). Der ATP-Verbrauch ist somit dem jeweiligen ATP-Spiegel angepaßt.

Im Anschluß an den Abfall erfolgen nur noch meßtechnisch bedingte Schwankungen des ATP-Spiegels um einen konstanten Mittelwert (Abb. 3 - 5, 10). Dieser Bereich der ATP-Kurve zeichnet sich somit durch Übereinstimmung von ATP-Produktion und ATP-Verbrauch aus, wobei die Größe der "output"-Geschwindigkeit der immer noch gleichmäßig verlaufenden Glykolyserate entspricht.

e) Der ATP-Verbrauch

ATP-verbrauchende Reaktionen scheinen einen hohen Stellenwert in reifer Plaque einzunehmen. Zum Zeitpunkt der Glukosezugabe werden durchschnittlich 99 936 von 100 000

gebildeten ATP-Molekülen für Biosynthesen (Baldwin, 1970), Transportprozesse (Stouthamer u. Bettenhaussen, 1973), Aufrechterhaltung der inter- und intrabakteriellen Ionenkonzentration (Stouthamer u. Bettenhausen, 1973), sowie zur Konstanterhaltung der zellulären Integrität (Stouthamer, 1973; Stouthamer u. Bettenhaussen, 1973) verbraucht.

(1) Nach Glukosezugabe

Die Aufnahme von Glukose durch Hexokinase und Phosphoenolpyruvattransferase (Klofat u. Mitarbeiter, 1969; Knowles u. Smith, 1970; Chapman u. Mitarbeiter, 1971) als auch Transport- und enzymatische Aktivierungsprozesse (Klofat u. Mitarbeiter, 1969; Knowles u. Smith, 1970; Stouthamer u. Bettenhaussen, 1973) können hohe Anforderungen an den ATP-pool stellen.

Erfolgt die Glukoseaufnahme sehr viel schneller als die gleichzeitig einsetzende Glykolyserate, kommt es zu einem Defizit an ATP-Molekülen innerhalb der Zelle und damit zum Absinken des ATP-Spiegels (Typ II: 1.1; 1.2; 1.3; 1.7; 1.3; 1.11; 1.15). Wesentlich langsamere, der ATP-Produktionsrate angepaßte Glukoseresorption erhöht den prozentualen Anteil der Phosphorylierungsprozesse am gesamten ATP-Verbrauch nur geringfügig, so daß bei verstärkt ablaufender ATP-Bildung ein Anstieg des ATP-pool resultiert (Typ I: 1.4; 1.5; 1.6; 1.9; 1.10; 1.12; 1.13; 1.14).

(2) Nach Einsetzen der Gegenregulation

Hat sich die Glukoseaufnahme der ATP-Produktion angeglichen; bleibt der ATP-Verbrauch für die ersten 15 min der Erhöhung des ATP-Spiegels konstant. Die anschließende, für gegenregulatorische Maßnahmen erforderliche Erhöhung des "ATP-output" kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen:

- Steigerung von biosynthetischen Prozessen durch Zunahme der Zellwanddicke (Critchley u. Saxton, 1970) und Bildung von extra- (Critchley u. Saxton, 1970; Critchley u. Bowen, 1970²²⁾; Van der Hoeven, 1971²²⁾) und intrazellulären Polysacchariden (Gibbons, 1962²³⁾; Critchley u. Saxton, 1970; Holms u. Mitarbeiter, 1972)
- Abbau von ATP durch ATP-ase, und damit Umwandlung von chemischer Energie in Wärmeenergie (Forrest, 1965; Critchley u. Saxton, 1970; Stouthamer u. Bettenhausen, 1973; Gadkari u. Stolp, 1975).

Für die in Plaque ablaufende Gegenregulation scheinen beide Vorgänge eine Rolle zu spielen. Während schneller Stop des Anstiegs der ATP-Kurve und deren erster Abfall durch ATP-ase herbeigeführt wird, ist der weitere Kurvenverlauf einer Steigerung der Biosyntheseleistungen vorbehalten.

Zum endgültigen Verständnis der zum Teil sehr komplexen Reaktionen des ATP-Spiegels in Zahnplaque dienen die Ergebnisse der unter gleichen Versuchsbedingungen mitgeführten Str. mutans-Stämme T3/53 und 441.

III. ATP-Spiegel und CO₂-Produktion von T3/53 und 441 22 und 46 Stunden nach Beimpfung

1. Der ATP-Spiegel

a) Der Grundspiegel

Tab. 2, Spalte 3 und Abb. 7 u. 8 zeigen den bei T3/53 und 441 nach 22 Std. und 46 Std. gemessenen ATP-Grundspiegel. Es fällt auf, daß seine Größe in allen 4 Fällen annähernd

²³⁾ Aus Ranke u. Mitarbeiter, 1967.

²²⁾ ...

konstant und damit unabhängig von Alter und Stamm der untersuchten Streptokokken ist. Der Mittelwert von 212,25 ng/ATP mg Str. mutans liegt um rund 100 ng ATP/mg Naßgewicht höher als der durchschnittliche ATP-Grundspiegel in 15 Plaqueproben.

Die mittlere ATP-Konzentration pro mg Str. mutans stimmt gut mit dem von Forrest (1965) ermittelten "ATP-pool-level" von 172 ng/ATP mg Naßgewicht überein, den er am Anfang der stationären Phase in Str. faecalis vorfand. Ähnlich hohe ATP-Spiegel in der Größenordnung von 172 - 258 ng ATP/mg Bakterienfeuchtgewicht (2 - 3 nMol ATP/mg Bakterientrockengewicht) berichten Franzen u. Binkley (1961, *Escherichia coli*), Kelly u. Syrett (1966, *Thiobacillus* sp.), Hempfling u. Mitarbeiter (1967, *Escherichia coli*), Mota u. Guerra (1969, Str. faecalis), Knowles u. Smith (1970, *Azotobacter vinelandii*), sowie Gadkari u. Stolp (1975, *Bdellovibrio bacteriovorus*).

Auch Untersuchungen jüngster Zeit an *Escherichia coli* (Mathis u. Brown, 1976) und Str. sanguis (Robrish u. Mitarbeiter, 1978) ergaben ATP-Konzentrationen unterhalb von 300 ng ATP/mg Naßgewicht (280 - 296 ng ATP/mg Naßgewicht) in ruhenden Bakterienkulturen.

Sowohl die geschilderten Literaturangaben als auch die eigenen Studien an 2 Str. mutans-Stämmen messen dem ATP-Spiegel in einer stationären Bakterienpopulation eine relativ hohe Konstanz bei.

b) "ATP-pool-level" nach Inkubation im Warburggefäß

(1) Einfluß des Bicarbonatpuffers

Wie Tab. 2, Spalte 4 und Abb. 7 u. 8 deutlich zeigen, führt Bicarbonat zu einer Erhöhung des ATP-Grundspiegels bei allen 4 Bakterienproben um ca. 100 %. Die annähernd gleiche Verdopplung in allen 4 Fällen läßt

auf identische pH-Verhältnisse bei T3/53 und 441 sowohl 22 als auch 46 Std. nach Beimpfung schließen. Eine Erklärung für den Anstieg des ATP-pool nach Pufferzugabe findet sich bei Plaque unter der gleichen Rubrik.

(2) Einfluß von 95 % N₂ und 5 % CO₂

Anaerobe Kulturbedingungen führen bei den 22 und 46 Std. alten Str. mutans-Stämmen zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen (Tab. 2, Spalte 5, Abb. 7 u. 8). Während T3/53 und 441 22 Std. nach Beimpfung den ATP-Spiegel etwa um die Hälfte des "HCO₃⁻-Spiegels" senken, erhöht sich bei den 46 Std. alten Stämmen der ATP-pool um weitere 50 % durch Begasung.

Das Verhalten nach 22 Std. deckt sich mit den Angaben von Strange u. Mitarbeiter (1963), die bei Aerobacter aerogenes ebenfalls einen 50 %igen Abfall des "ATP-pool-level" nach Umstellen auf anaerobe Verhältnisse beobachteten.

Str. mutans zählt zu den fakultativ anaeroben Mikroorganismen, die sowohl aeroben als auch anaeroben Energiestoffwechsel besitzen. Durch Umschalten auf anaerobe Bedingungen fällt der ATP-Spiegel aufgrund der wesentlich geringeren ATP-Produktion während anaerober Glykolyse bei annähernd gleichbleibendem ATP-Verbrauch. Das Verhältnis von "HCO₃⁻"- zu "N₂/CO₂-Spiegel" gibt die Relation zwischen aeroben und anaeroben Energiegewinn in T3/53 und 441 wieder. Dieses Verhältnis ist in beiden Stämmen gleich und beträgt 2:1. Demnach kann sowohl T3/53 als auch 441 unter aeroben Kulturbedingungen doppelt soviel ATP wie unter anaeroben Verhältnissen produzieren.

Neben fast identischen Grund- und "HCO₃⁻" Spiegeln weist auch die gleiche Beziehung zwischen aerober und anaerober Glykolyse auf enge Verwandtschaft von T3/53

und 441 hin.

Nicht identisch in beiden Stämmen ist der bis jetzt konstant gebliebene ATP-Verbrauch, der sich in der unterschiedlichen Abfallgeschwindigkeit des ATP-pool von T3/53 und 441 nach 10minütigem Begasen wieder spiegelt. Sie beträgt für T3/53 und 441 (22 Std. alt) 23,2 ng ATP/mg T3/53 x min bzw. 36,6 ng ATP/mg 441 x min und entspricht der von Knowles u. Smith (1970) an *Azotobacter vinelandii* bestimmten anaeroben Abbaurate von ATP. Je höher dieser konstante ATP-Verbrauch bei einem bestimmten Bakterium ist, desto schneller fällt der aerobe ATP-Spiegel auf den anaeroben Wert ab. Demzufolge besitzt 441 einen größeren anaeroben ATP-Verbrauch (36,6 ng ATP/mg x min) als T3/53 (23,3 ng ATP/mg x min). Diese Beziehung wird sich später im Vergleich der K-Werte wiederfinden.

Völlig unerklärlich erscheint zunächst ein Anstieg des ATP-pool nach Begasen in den 46 Std. alten Str. mutans-Stämmen T3/53 und 441 (Abb. 8). Während der 24stündigen Lagerung im Kühlschrank bei 4° C kommt es nicht nur zu einer teilweise reversiblen Schädigung der anaeroben Glykolyse (vgl. Abb. 7 u. 8), sondern auch zu einer scheinbar irreversiblen Blockierung der Atmungskette und damit auch des aeroben Energiestoffwechsels. Die fakultativen Anaerobier scheinen ihre Fähigkeit, auf doppelte Weise ATP zu erzeugen, verloren bzw. stark zugunsten der anaeroben Glykolyse eingeschränkt zu haben; sie verhalten sich gewissermaßen wie "obligat" anaerobe Keime. Optimal anaerobe Bedingungen im Warburgapparat heben die partiell reversible Schädigung im anaeroben Glukoseabbau in dem Maße wieder auf, daß eine irreversible Restschädigung verbleibt. Deshalb kann auch die ATP-Produktion nach Glukosezugabe in 46 Std. alten Str. mutans-Stämmen nur vermindert ablaufen (vgl. Abb. 7 u. 8).

c) ATP-Spiegel nach Glukosezufuhr

Abb. 7 u. 8 zeigen das Verhalten des ATP-Spiegels der 22 bzw. 46 Std. alten Str. mutans-Stämme T3/53 und 441 nach Zukippen von Glukose.

Die in Abb. 7 dargestellten 22 Std. alten Streptokokkenstämme zeigen einen 6fachen (T3/53) bzw. 5fachen (441) Anstieg des ATP-pool innerhalb der ersten 15 min nach Glukosezugabe. In den zweiten 15 min fällt die Steigung wesentlich ab und erreicht schließlich im Maximum des ATP-Spiegels den Wert 0. Sowohl T3/53 als auch 441 durchlaufen den fast gleich hohen ATP-Gipfel 30 min nach Glukosezufuhr. Daran anschließend erfolgt zunächst exponentieller, dann nahezu linearer Abfall des ATP-pool, der selbst nach 200 min noch nicht beendet ist.

46 Std. nach Beimpfung zeigen beide Stämme einen 1,6fachen Anstieg des ATP-Spiegels, der bereits 15 min nach Glukosezugabe beendet ist und gleichfalls linear verläuft. Die nach 15 min erreichten Maximalwerte des "ATP-pool-level" betragen für T3/53 990 ng ATP/mg x min und für 441 1179 ng ATP/mg x min, unterscheiden sich also nur geringfügig. Das weitere Absinken des ATP-Spiegels erfolgt analog zu den 22 Std. alten Stämmen, allerdings mit 50 % kleinerer Abfallgeschwindigkeit, so daß die mittlere Endhöhe des ATP-pool von T3/53 und 441 nach 205 - 210 min in Abb. 7 mit 689 ng ATP/mg T3/53 bzw. 441 und Abb. 8 mit 643 ng ATP/mg T3/53 bzw. 441 näherungsweise gleich ist.

Der 22 Std. nach Beimpfung bei T3/53 und 441 durch Glukosezugabe hervorgerufene initiale Anstieg des ATP-Spiegels um den Faktor 6 von 247 ng auf 1547 ng ATP/mg T3/53 bzw. um den Multiplikator 5 von 328 ng auf 1736 ng ATP/mg 441 stimmt gut mit Angaben aus der Literatur überein.

So berichten Mota u. Guerra (1969) von einer 4,5fachen Erhöhung des ATP-pool (174 ng - 783 ng ATP/mg Naßgewicht) von gewaschenen Str. faecalis-Suspensionen, während Gad-

kari u. Stolp (1975) bei *Bdellovibrio bacteriovorus* einen 5fachen Anstieg (258 ng - 1290 ng ATP/mg Naßgewicht) innerhalb der ersten 15 min nach Substratzufuhr bei gleichzeitig fehlendem Wachstumsfaktor vorfanden. Die von Mathis u. Brown (1976) ermittelte 4fache Anhebung des "ATP-pool-level" bei *Escherichia coli*, wie auch der 5fache Anstieg bei *Bdellovibrio bacteriovorus* (Gadkari u. Stolp, 1975) waren nach 15 min beendet, wohingegen Mota u. Guerra (1969) eine weitere geringfügige Erhebung des ATP-Spiegels beobachteten, die etwa 15 - 20 min nach dem initialen Anstieg vorüber war. Der in der Literatur angegebene Zeitpunkt für die Gegenregulation liegt somit bei 15 min nach Glukosezugabe und entspricht den bei T3/53 und 441 sowohl nach 22 als auch nach 46 Std. ermittelten Werten.

2) Die CO₂-Produktion

Wie Tab. 3, Spalte 3 und Abb. 7, 8 u. 12 zeigen, ist die CO₂-Produktion von T3/53 und 441 sowohl 22 als auch 46 Std. nach Beimpfung verschieden. Während sie bei T3/53 innerhalb von 24 Std. um 70 % absinkt, ist bei 441 im gleichen Zeitraum nur 55 % Abfall zu verzeichnen.

Vergleicht man die CO₂- und somit auch die ATP-Produktionsrate der beiden Str. mutans-Stämme miteinander, so ergibt sich, daß 441 nach 22 Std. doppelt soviel μl CO₂/mg x min wie T3/53 bilden kann. Der unterschiedliche Abfall der ATP-Bildungsgeschwindigkeit nach 24stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank führt schließlich zu einer dreimal höheren CO₂-Bildungsrate von 441 (46 Std.) gegenüber T3/53 (46 Std.)

Die bei gleichem Alter der Stämme unterschiedliche ATP-Produktionsrate ist somit als eine spezifische Bakterienkonstante einzuordnen. Sie verläuft linear (Abb. 7, 8, 10 u. 12) und nähert sich entsprechend ihrer Steigung nach 40 - 240 min asymptotisch einem Grenzwert von ca. 58 μl CO₂/mg Str. mutans (Tab. 4, Spalte 2).

3. ATP-Spiegel und CO₂-Produktion

a) Die Konstanten K* und K

Vergleicht man die Ergebnisse von Spalte 3 und 4 der Tab. 3, so fällt auf, daß dem prozentualen Absinken der CO₂-Produktionsrate nach 24stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank auch ein gleichgroßer Abfall der initialen Anstiegs geschwindigkeit des ATP-Spiegels innerhalb desselben Str. mutans-Stammes gegenübersteht. Anders ausgedrückt bedeutet dies ein annähernd gleiches Verhältnis von ATP-Bildungsrate und Steigung der ATP-Kurve im unmittelbaren Anschluß an Glukosezufuhr sowohl bei T3/53 als auch bei 441, unabhängig vom Alter des jeweiligen Stammes. Die entsprechenden Bakterienkonstanten K* und K sind in Tab. 3, Spalte 5 u. 6, aufgeführt. Sie sind zwischen T3/53 und 441 signifikant verschieden, während sie beim gleichen Stamm nur geringfügig voneinander abweichen.

Wie auf Seite 45 schon ausführlich besprochen, gibt K den Nettogewinn an Mol ATP im Verhältnis zur anaerob gebildeten Säuremenge in Mol H⁺ an. Da sich letztere wiederum in ATP-Einheiten umrechnen läßt (1,25 Mol ATP/Mol H⁺), repräsentiert K die Nettomenge an ATP, welche pro erzeugten 1,25 Mol ATP in den bakteriellen ATP-pool einfließt.

Nach der Gleichung $K = \text{ATP}_{\text{prod.}} - \text{ATP}_{\text{verbr.}}$ vereinigt K die Summe aus ATP-Produktion und ATP-Verbrauch. Nachdem $\text{ATP}_{\text{prod.}}$ (1,25 Mol ATP/Mol H⁺) als konstant in beiden Bakterien betrachtet werden kann, sind die bei T3/53 und 441 auftretenden Variationen der K-Werte allein auf den pro Bakterium unterschiedlichen ATP-Verbrauch ($\text{ATP}_{\text{verbr.}}$) zurückzuführen.

Dieser Verbrauch errechnet sich bei T3/53 und 441 zu $1,25 - 5,95 \times 10^{-3} = 1,244$ Mol $\text{ATP}_{\text{verbr.}}$ bzw. $1,25 - 2,72 \times 10^{-3} = 1,248$ Mol $\text{ATP}_{\text{verbr.}}$. Prozentual ausgedrückt werden 99,528 % bzw. 99,782 % des gebildeten ATP bei T3/53 bzw. 441 verbraucht, so daß nur eine geringe Anzahl von

100 000 anaerob erzeugten ATP-Molekülen effektiv in den ATP-pool einfließen und ihn erhöhen kann.

b) Die initiale Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-Spiegels

Die an sich minuziösen rechnerischen Unterschiede im ATP-Verbrauch von T3/53 und 441 werden durch die Geschwindigkeit der ATP-Produktion wesentlich verstärkt, so daß z. B. bei gleich angenommener ATP-(CO₂)-Bildungsrate erhebliche Unterschiede bezüglich der initialen Anstiegsgeschwindigkeit und damit auch des erreichten ATP-Maximums bestehen. Ein Rechenbeispiel soll dies verdeutlichen:

Angenommen, die CO₂-Produktionsrate wäre in beiden Str. mutans-Stämmen nach 22 Std. gleich und betrage 0,78 µl CO₂/mg x min, dann entspräche dies bei T3/53 einer initialen Anstiegsgeschwindigkeit von 86,6 ng ATP/mg x min, bei einem Nettoeinfluß von 111 ng ATP/µl CO₂ (Tab. 3, Spalte 3, 4, 5), während der ATP-Spiegel bei 441 - entsprechend dem höheren ATP-Verbrauch - in der gleichen Zeit nur um 61,8 ng ATP/µl CO₂ x 0,78 µl CO₂/mg x min = 48,2 ng ATP/mg x min ansteigen würde.

Die bei gleich angenommener CO₂-Produktionsrate deutlich hervortretenden Unterschiede bezüglich der initialen Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-pool zwischen den beiden 22 und 46 Std. alten Str. mutans-Stämmen aufgrund des bakterienspezifischen ATP-Verbrauchs werden durch die verschiedenen CO₂-Bildungsgeschwindigkeiten von T3/53 und 441 verwischt. Der im Vergleich mit T3/53 doppelte "ATP-output" wird bei 441 durch zwei- bis dreifach höhere ATP-Produktion kompensiert, so daß am Ende gleiche Steigerungsraten des ATP-Spiegels resultieren (Tab. 3, Spalte 3 u. 4; Abb. 7 u. 8).

Zusammenfassend kann deshalb der bei einem Einzelstamm (T3/53 bzw. 441) nach 22 und 46 Std. beobachtete, unterschiedliche Anstieg des ATP-pool auf die zu diesem Zeit-

punkt ebenfalls unterschiedliche ATP-Produktionsrate bei unverändert gebliebenem ATP-Verbrauch zurückgeführt werden. Die bei verschiedenen Stämmen (T3/53 und 441) gefundene Deckungsgleichheit der ATP-Kurven ist das zufällige Ergebnis von reziproker Proportionalität zwischen ATP-Verbrauch und ATP-Bildung. Ein Rechenbeispiel mit postulierter, identischer CO_2 -Produktion von T3/53 und 441 verdeutlicht, daß die unter dieser Voraussetzung gewonnenen, unterschiedlich steil ansteigenden ATP-Kurven auf den bakterienspezifischen ATP-Verbrauch zurückzuführen sind.

c) Die Gegenregulation

Der auf den initialen und linearen Anstieg des ATP-Spiegels folgende Abfall - 15 - 30 min nach Glukosezugabe - setzt sehr rapide ein und zeigt zunächst 30 - 45 min lang exponentiellen Verlauf. Das im Vergleich mit 15 Plaqueproben bei T3/53 und 441 sehr ähnliche Geschwindigkeitsprofil vom Stop des ATP-pool-Anstiegs und dessen vorläufiger Abfall weist auf grundsätzlich ähnliche, gegenregulatorische Maßnahmen hin.

Mit der gleichen Latenzzeit von 15 min setzt die Gegenregulation durch Erhöhung des ATP-Verbrauchs ein. Hierzu stehen den untersuchten Einzelstämmen dieselben Möglichkeiten wie der Zahnplaque zur Wahl, nämlich zusätzlicher ATP-Verbrauch durch ATP-ase und gesteigerte Biosyntheseleistungen, wie Bildung von extra- und intrazellulären Polysacchariden und Verstärkung der Bakterienzellwand.

Die Beobachtung, daß beide 22 Std. alten Str. mutans-Stämme zwischen 15 und 30 min nach Substratzufuhr eine weitere geringfügige Erhöhung des "ATP-pool-level" aufweisen (Abb. 7), ist auf gleichstarke und unabhängig von der zellulären ATP-Konzentration einsetzende Gegenregulation zurückzuführen. Deshalb ist der Zeitbedarf, den ein verstärkt ablaufender ATP-Verbrauch benötigt, um die

bis jetzt erhöhte ATP-Produktion einzuholen, bei schnellerer ATP-Bildung (T3/53 u. 441 nach 22 Std.) größer als bei verlangsamter Glykolyse (T3/53 u. 441 nach 46 Std.). Würde sich die Einholgeschwindigkeit und damit auch der ATP-Verbrauch der zum Zeitpunkt der Gegenregulation vorhandenen ATP-Bildungsgeschwindigkeit anpassen, würde der Umkehrpunkt der ATP-Kurve jedesmal zur gleichen Zeit (15 min nach Substratzugabe) erreicht werden. Auf diese Weise ist es also zu erklären, warum die 46 Std. alten Str. mutans-Stämme wesentlich schneller ihr ATP-Maximum durchlaufen als die 22 Std. nach Beimpfung untersuchten Streptokokken.

d) Der Abfall des ATP-Spiegels

Nach Erreichen des ATP-Gipfels fällt die ATP-Kurve der Str. mutans-Stämme zunächst für 30 - 45 min exponentiell ab. Daran anschließend erfolgt nahezu linearer Abfall des ATP-Spiegels, der bei T3/53 und 441 - 22 Std. nach Beimpfung - wesentlich steiler verläuft als bei den 46 Std. alten Stämmen.

Der exponentielle Kurvenverlauf deutet auf einen von der jeweiligen ATP-Konzentration abhängigen Abbau durch ATP-ase hin, denn je höher das erreichte ATP-Maximum ist, umso steiler verläuft der Abfall des ATP-Spiegels (vgl. Abb 7 u. 8).

Das etwa 60 min nach Substratzufuhr beginnende, lineare Absinken des ATP-Spiegels wird durch konstant höheren ATP-Verbrauch als Folge von gesteigerten Biosyntheseleistungen der Bakterienzelle, bei gleichzeitig konstant kleinerer ATP-Produktion verursacht. Scheinbar reicht die beobachtete, lineare ATP-Ausflußrate nicht aus, um den immer noch erhöhten ATP-Spiegel schnell auf seinen Ausgangswert zurückzuführen.

Trotz maximaler Abflußrate bei beiden Str. mutans-Stämmen sinkt die ATP-Konzentration in den 22 Std. alten

Stämmen signifikant schneller als 46 Std. nach Beimpfung (vgl. Abb. 7 u. 8). Diese zunächst im Widerspruch zu einem in beiden Stämmen konstanten und gleichgroßen "ATP-output" stehende Beobachtung erklärt sich folgendermaßen:

Der Beginn des linearen Abfalls fällt bei den 22 Std. alten Str. mutans-Stämmen mit der Erschöpfung von Glukose im Ansatz zusammen. Die bei fehlender ATP-Produktion unvermindert ablaufende Polysaccharidsynthese senkt den ATP-Spiegel schneller als annähernd gleich großer ATP-Verbrauch bei noch vorhandenem Glukoseabbau (T3/53 u. 441, 46 Std. alt).

Die unter gleichen Versuchsbedingungen mitgeführten Str. mutans-Stämme zeigen mit wenigen Ausnahmen ein ähnliches Reaktions- und Regulationsverhalten wie die untersuchten Plaqueproben. Gemeinsamkeiten und Unterschiede werden im letzten Abschnitt dieses Kapitels noch einmal zusammenfassend und ergänzend aufgeführt.

IV. Voraussetzungen für vergleichende Untersuchungen der Stoffwechselaktivität von Plaque und Str. mutans

Vergleich von qualitativen Stoffwechselleistungen einer willkürlich entnommenen Plaque und zweier Str. mutans-Stämme anhand des ATP-Spiegels und der CO_2 -Produktion nach Glukosezufuhr ist nur dann sinnvoll, wenn die eingewogene Biomasse annähernd die gleiche Anzahl an lebensfähigen Mikroorganismen enthält. Geht man von gleichen quantitativen Voraussetzungen aus, sind die beobachteten Gemeinsamkeiten und Unterschiede rein qualitativer Natur.

1. Extinktionsmessung

Die an 1:100 ($\approx 0,1$ mg Bakteriennaßgewicht/ml) mit physiolog. Kochsalzlösung verdünnten Plaque- und Str. mutans-Suspensionen durchgeführten Extinktionsmessungen erbrachten übereinstimmende Ergebnisse. Der bei 15 Plaque- und 4 Str. mutans-Proben gefundene Mittelwert der Extink-

tion betrug 0,208, bei einer Standardabweichung von 0,065. Daraus ergeben sich annähernd gleiche Bakterienzahlen in den Warburgansätzen.

2. Fluoreszenzmikroskopie

Abb. 9 zeigt die Häufigkeitsverteilung von rot fluoreszierenden Bakterien in den Deckglaspräparaten von 15 wahllos entnommenen Plaqueproben. Im Durchschnitt wurden 16,13 % rot- und 83,87 % grün-leuchtende Keime pro ausgezähltem Gesichtsfeld gefunden, bei einer Standardabweichung von 5,18.

Die in gleicher Weise untersuchten Str. mutans-Proben lieferten 17,80 % rote und 82,20 % grüne Kokken.

Da nach Angaben aus der Literatur (Strugger, 1940) rot fluoreszierende Keime als abgestorben, grün leuchtende als lebend zu bezeichnen sind, befanden sich etwa 80 % stoffwechselaktive Mikroorganismen sowohl in den Plaque- als auch in den Str. mutans-Proben. Diese Beobachtung stimmt mit der von Theilade u. Theilade (1970) angegebenen Anzahl von 80 % lebenden Organismen in untersuchter Glatflächen-plaque überein.

Die Ergebnisse von Extinktionsmessung und Fluoreszenzmikroskopie beweisen, daß bei den annähernd gleich konzentrierten Plaque- und Str. mutans-Suspensionen ebenfalls gleich viele, lebende Mikroorganismen vorhanden sind und folglich die gefundenen Unterschiede und Gemeinsamkeiten auf verschiedene oder identische Stoffwechselleistungen zurückzuführen sind.

V. ATP-Spiegel und CO₂-Produktion von 15 Plaqueproben im Vergleich mit Str. mutans

Abb. 10 zeigt ATP-Spiegel und CO₂-Produktion eines 22 Std. alten Str. mutans-Stammes (441) und einer reifen Plaqueprobe (1.5) im Vergleich.

1. Der ATP-Spiegel

a) Der Grundspiegel

Abb. 10 verdeutlicht noch einmal die Diskrepanz in den ATP-Grundspiegelwerten von isolierten Einzelstämmen und gemischten Bakterienpopulationen, wie einer Zahnplaque. Der durchschnittliche Grundspiegel von 4 Str. mutans-Proben (T3/53 u. 441, 22 u. 46 Std. alt) beträgt 212,25 ng ATP/mg Str. mutans und liegt um ca. 100 ng ATP/mg Naßgewicht höher als der mittlere Ausgangsspiegel von 15 willkürlich gewonnenen Plaqueproben mit 108,13 ng ATP/mg Plaque.

Beide Werte stimmen gut mit Literaturangaben überein, wobei ATP-Spiegel von 172 ng - 258 ng ATP/mg Naßgewicht am Anfang der stationären Phase einer Bakterienkultur gefunden wurden (s. S. 51), während ATP-Konzentrationen von ca. 100 ng ATP/mg Naßgewicht (Forrest, 1965; Mathis u. Brown, 1976) nach längerer Hungerperiode ("starvation") beobachtet wurden.

Demzufolge ist eine reife Plaque als ruhende Bakterienmischkultur zu bezeichnen, die sich, bedingt durch intermittierende Substratzufuhr (Nahrungsaufnahme), ständig zwischen stationärem Zustand und Hungerphase hin- und herbewegt, die meiste Zeit allerdings im Hungerstadium verbringt.

b) ATP-Spiegel nach Inkubation im Warburggefäß

(1) Einfluß des Bicarbonatpuffers

Aufgrund sich fortwährend ändernder Stoffwechsellage finden sich in Zeiten von Substratangebot mehr saure, in Perioden von Substratmangel mehr neutrale bis schwach alkalische Verhältnisse in Zahnplaque vor, während die relativ jungen Str. mutans-Stämme ein weitgehend konstantes pH-Milieu aufweisen. Dementsprechend können letztere auch nur in einer Richtung ihren ATP-Spiegel nach Pufferzugabe verändern. So zeigen alle

untersuchten Str. mutans-Proben eine Erhöhung um 100 %, während Plaque je nach bakterieller Zusammensetzung und Stoffwechsellage sowohl mit Abfall als auch Anstieg des ATP-pool nach Pufferzugabe um beidemal durchschnittlich 25 % des ATP-Grundspiegels reagieren kann.

(2) Einfluß der Begasung

Sowohl Plaque als auch T3/53 und 441 können bei 95 % N₂ und 5 % CO₂ ihren ATP-Spiegel nach oben und nach unten verändern (Abb. 3 - 5, 7, 8, 10; Tab. 2, Spalte 5).

Sind die Reaktionen einer gemischten Bakterienpopulation mit einer Erhöhung und Senkung des ATP-pool um ca. 25 % des "HCO₃⁻-Spiegels" aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung aus aeroben, fakultativ und obligat anaeroben Keimen zu erklären (s. S. 40), so ist ein bei Str. mutans nach 46 Std. beobachteter Anstieg des ATP-Spiegels durch Begasung anderweitig zu deuten. Aufbewahrung im Kühlschrank führt bei den fakultativ anaeroben Streptokokken anscheinend zu einer irreversiblen Schädigung des aeroben Energiestoffwechsels, verbunden mit einer teilweise reversiblen Hemmung der anaeroben Glykolyse (vgl. Abb. 7 u. 8). Abfall und Anstieg des "ATP-pool-level" bei Str. mutans erfolgt um 50 % des "HCO₃⁻-Spiegels" und stimmt gut mit Angaben aus der Literatur überein (s. S. 52).

C) ATP-Spiegel nach Glukosezufuhr

(1) Der initiale Anstieg

Wie Abb. 10 verdeutlicht, reagieren 441 und Plaqueprobe 1.5 mit einer sofortigen Erhöhung des ATP-Spiegels. Der zunächst lineare Anstieg verläuft bei 441 steiler als bei Plaque 1.5 und ist nach 15 - 30 min bei allen untersuchten Plaques und Str. mutans-Stämmen beendet. Ein Restanstieg nach 15 min findet sich bei dem dargestell-

ten, 22 Std. alten Str. mutans-Stamm (441) und seinem Korrelat (T3/53), sowie bei 3 von 15 Plaqueproben. Seine Existenz ist auf längere Einholzeit für die Gegenregulation bei konstant erhöhtem ATP-Verbrauch und sehr schneller ATP-Produktionsrate zurückzuführen (s.S. 58/59).

Der bei 7 von 15 Probanden gefundene Abfall des ATP-pool nach Glukosezugabe um durchschnittlich 50 ng ATP/mg Plaque x 15 min wird durch Mißverhältnis zwischen ATP-verbrauchender Glukoseresorption und gleichzeitig einsetzender ATP-Bildung verursacht (s.S. 49).

Die Erhöhung des ATP-Spiegels innerhalb von 15 min ist bei Plaque sehr variabel (s.S.41/42) und beträgt im Durchschnitt 50 ng ATP/mg Plaque x 15 min. Dieser Wert entspricht einem mittleren Anstieg des jeweiligen " N_2/CO_2 -Spiegels" um das 0,37fache.

Im Gegensatz zu den 15 Plaqueproben steigt der ATP-Spiegel bei Str. mutans 22 Std. nach Beimpfung um das 5- bis 6fache seines Begasungswertes, nach Aufbewahrung im Kühlschrank nur noch um das 1,6fache in den ersten 15 min an.

Die bei 22 Std. alten Str. mutans-Stämmen gefundenen Ergebnisse stimmen gut mit Angaben aus der Literatur überein (s.S.54/55) während für die älteren Streptokokken keine Literaturhinweise existieren. Der beobachteten, durchschnittlichen Erhöhung des "ATP-pool-level" in Plaque um das 0,37fache = 37 % kommt das Ergebnis von Dietzler u. Mitarbeiter (1973) sehr nahe.

(2) Die Gegenregulation

15 min nach linearem Anstieg des ATP-Spiegels bzw. kurz vorher setzt bei Plaque und den Str. mutans-Proben die Gegenregulation ein, erkennbar am Abflachen der Kurven-

tangente. Die Geschwindigkeit der regulativen Maßnahme ist sehr groß, so daß mit wenigen Ausnahmen (T3/53 und 441 nach 22 Std.; Plaque 1.1; 1.6; 1.8) das ATP-Maximum ebenfalls nach 15 min durchlaufen wird. Höhe des ATP-pool nach 15 min und ATP-Gipfel sind demnach bei nahezu allen untersuchten Fällen identisch, so daß eine direkte Korrelation zwischen initialer Anstiegsgeschwindigkeit und erreichtem Maximalwert des ATP-Spiegels besteht.

Für die in allen untersuchten Fällen zum selben Zeitpunkt und in gleicher Weise einsetzende Gegenregulation kommen zwei den ATP-Verbrauch erhöhende Mechanismen in Frage:

- Abbau von ATP durch Phosphatase (ATP-ase) und
- Verstärkte, ATP-verbrauchende Biosyntheseleistungen (Polysaccharidsynthese und Verstärkung der Zellwand).

Sowohl Plaque als auch Str. mutans bedienen sich beider Maßnahmen, um den erhöhten, zellulären ATP-Spiegel wieder zu senken; hierbei fungiert ATP-ase als Kurzzeitreulator, während gesteigerte Biosyntheseleistungen den "ATP-pool-level" langfristig konstant halten (Plaque), bzw. weiter zu senken versuchen (T3/53 u. 441).

Beginn (15 min nach Anstieg des ATP-Spiegels) und Dauer (30 - 45 min nach Durchlaufen des ATP-Maximums) der wahrscheinlich durch ATP-ase verursachten Kurzzeitre-
gulation stimmen zwischen Plaque und Str. mutans, sowie mit neueren Literaturhinweisen (s. S. 43) überein.

2. Die CO₂-Produktion

a) Die CO₂-Endkonzentration/CO₂-Ansatz

Tab. 4, Spalte 2, zeigt die in Plaque- und Str. mutans-Proben gefundene Endkonzentration an $\mu\text{l CO}_2/\text{mg NaBgewicht}$ nach vollständigem Abbau von Glukose im CO₂-Ansatz.

Der Mittelwert für die 280 min lang ausgemessenen Plaqueproben beträgt 59,20 $\mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque}$ und unterscheidet sich nur wenig von der zum gleichen Zeitpunkt vorhandenen CO_2 -Menge in den Str. mutans-Ansätzen mit einer durchschnittlichen Größe von 57,91 $\mu\text{l CO}_2/\text{mg Str. mutans}$.

Die theoretisch ermittelte CO_2 -Konzentration/mg Naßgewicht errechnet sich aus der im CO_2 -Ansatz vorhandenen Menge an Glukose pro mg Plaque bzw. Str. mutans. Sie beträgt 20 $\mu\text{Mol Glukose/CO}_2$ -Ansatz oder 2 $\mu\text{Mol Glukose/mg Plaque bzw. Str. mutans}$, bei einer eingesetzten Plaque- bzw. bakterienmenge von ungefähr 10 mg. Da bei anaerober Glykolyse 2 Mol H^+ /Mol Glukose entstehen, entspricht die zugekippte Glukosemenge bei vollständigem Abbau einer Protonenkonzentration von 4 $\mu\text{MolH}^+/\text{mg Bakterien}$, die mit 22,4 (Molvolumen) multipliziert eine CO_2 -Konzentration von 89,6 $\mu\text{l CO}_2/\text{mg Bakterien}$ am Ende des Warburgversuches ergeben sollte.

Aus der Differenz zwischen theoretisch und experimentell gefundener Kohlendioxidmenge folgt, daß ein Teil der eingesetzten Glukose dem katabolen Stoffwechsel entzogen und zur Biosynthese von Zellwandbausteinen, sowie extra- und intrazellulären Polysacchariden verwendet wird. Dieser anaerobe Anteil ist für Plaque und Str. mutans nahezu identisch und errechnet sich zu 34 % (Plaque) bzw. 36 % (Str. mutans). Der von Baldwin (1970) angegebene Prozentsatz an Substrat, der nicht zur Energieproduktion verwendet, sondern in die Bakterienzelle inkorporiert wird, beträgt 26 - 32 % und entspricht den experimentell gefundenen Werten. Abb. 11 verdeutlicht noch einmal die Zusammenhänge.

b) Die CO_2 -Produktionsrate

Während die nach 280 min erreichte CO_2 -Endkonzentration in den Plaque- und Str. mutans-Ansätzen weitgehend übereinstimmt (Tab. 4, Spalte 2), so unterscheidet sich die Geschwindigkeit der CO_2 -Bildung - mit Ausnahme von T3/53 (46 Std. alt) - doch wesentlich (Abb. 12).

Die in allen Fällen bis kurz vor Erschöpfung des Substrats linear verlaufende CO_2 -Produktionsrate ist am höchsten in den 22 Std. alten Str. mutans-Stämmen, wobei sich vor allem 441 als schneller Säurebildner erweist. Nach 24stündiger Lagerung im Kühlschrank fällt die Glykolysegeschwindigkeit in beiden Fällen ungleich ab (55 %: 441; 70 %: T3/53), was neben exogen verursachter Störung auch auf endogen bedingte, bakterienspezifische Ursachen schließen läßt.

Die CO_2 -Produktionsrate in allen 15 Plaqueproben variiert erstaunlich wenig und beträgt im Durchschnitt $0,22 \mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque} \times \text{min}$ (Abb. 6).

Wie Abb. 12 zeigt, fällt die bei T3/53 nach 46 Std. beobachtete CO_2 -Bildungsgeschwindigkeit ($0,23 \mu\text{l CO}_2/\text{mg T3/53} \times \text{min}$) mit der CO_2 -Produktionsrate von Plaque 1.15 ($0,23 \mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque} \times \text{min}$) zusammen. Daß trotz gleicher ATP-Produktionsraten unterschiedliche ATP-Anstiegsgeschwindigkeiten und damit ATP-Maxima auftreten können, erklärt der folgende Abschnitt.

3. Korrelation zwischen ATP-Spiegel und CO_2 -Produktion

a) Die Konstante K

Die Untersuchungen an 2 Str. mutans-Stämmen haben gezeigt, daß eine enge Beziehung zwischen ATP-Produktionsrate und initialer Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-pool besteht, allerdings nur innerhalb eines bestimmten Bakterienstammes.

(1) Definition

Um die Zusammenhänge bezüglich CO_2 -Bildungsrate und Höhe des ATP-Spiegels bei zwei verschiedenen Str. mutans-Stämmen und 15 willkürlich entnommenen Plaqueproben zu verstehen, wurden die Größen K^* und K eingeführt, die sich bei T3/53 und 441 eindeutig als Bakterienkonstanten erwiesen. Nach der Gleichung $K = \text{ATP}_{\text{prod.}} - \text{ATP}_{\text{verbr.}}$ bezeichnet K den Nettogewinn an Mol ATP, der sich aus den

glykolytisch pro Mol H^+ erzeugten und anderweitig verbrauchten Mol ATP ergibt. Ist die auf dem Weg der anaeroben Glykolyse erzeugte ATP-Menge in fast allen Bakterien ($1,25 \text{ ATP/Mol } H^+$) identisch, so variiert der ATP-Verbrauch und damit K doch erheblich.

(2) Anwendungsmöglichkeiten

Ist K bekannt, so kann man mit Hilfe der experimentell ermittelten ATP-Produktionsrate den initialen und linearen Anstieg des zellulären ATP-pool nach Glukosezugabe berechnen. Da sich gegenregulatorische Maßnahmen der Bakterienzelle immer zum gleichen Zeitpunkt und mit gleicher Vehemenz einstellen, ist das ATP-Maximum in seiner Höhe bestimmbar, zumindest aber abschätzbar.

Umgekehrt kann man K aus der initialen Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-Spiegels bei bekannter ATP-Produktionsrate für ein noch unbekanntes Bakterium bzw. eine gemischte Bakterienpopulation bestimmen. Da sich letztere aus verschiedenen Einzelbakterien zusammensetzt, ist die so ermittelte Populationskonstante die Summe mehrerer Einzelkonstanten.

(3) Größe der Konstanten K

Die für 15 Plaqueproben ermittelten K-Werte sind in Tab. 1, Spalte 5, aufgelistet und bewegen sich zwischen $0,1 \times 10^{-3}$ und $2,7 \times 10^{-3}$ Mol ATP-Gewinn pro Mol gebildeten H^+ -Ionen. Der Mittelwert beträgt $0,8 \times 10^{-3}$ und kann nach der Gleichung $K = \text{ATP}_{\text{prod.}} - \text{ATP}_{\text{verbr.}}$ leicht in den plaquespezifischen ATP-Verbrauch umgesetzt werden. Dieser ist für alle Plaqueproben sehr hoch und beträgt im Durchschnitt $1,2492 \times 10^{-3}$ Mol $\text{ATP}_{\text{verbr.}}$ pro $1,2500$ Mol $\text{ATP}_{\text{prod.}}$.

In Prozent sind das 99,936 % verbrauchte pro 100 % gebildete ATP-Moleküle, oder in Zahlen ausgedrückt: Von 100 000 glykolytisch gebildeten ATP-Molekülen werden 99 936 für Biosynthesen, Transportprozesse, Aufrecht-

erhaltung inter- und intrabakterieller Ionenkonzentrationen und Konstanterhaltung der zellulären Integrität verbraucht. Die Differenz von 64 ATP-Molekülen fließt als Nettogewinn in den ATP-pool ein, der bei zunächst konstantem ATP-Verbrauch linear ansteigt.

Die ermittelten K-Werte von beiden Str. mutans-Stämmen liegen im gleichen Größenbereich wie die entsprechenden Plaquewerte, wobei T3/53 eine mittlere Konstante K von $5,95 \times 10^{-3}$ und 441 von $2,72 \times 10^{-3}$ besitzt. Dies entspricht einem Verbrauch von 99 528 bzw. 99 782 Molekülen ATP für T3/53 bzw. 441 pro 100 000 produzierte ATP-Moleküle. Je größer also K, desto kleiner wird der "ATP-output" für ein bestimmtes Bakterium oder eine Plaqueprobe; diese Beziehung geht aus der Gleichung $ATP_{\text{verbr.}} = ATP_{\text{prod.}} - K$ hervor.

b) K und die CO₂-Produktionsrate

Vergleicht man in Abb. 10 die eingezeichneten Anstiegsgeschwindigkeiten des ATP-Spiegels mit den dazugehörigen CO₂-Produktionsraten, so ergeben sich rein zufällig die fast identischen K*-Größen von 61,8 ng ATP/μl CO₂ für 441 und 52,5 ng ATP/μl CO₂ für Plaqueprobe 1.5. Die entsprechenden K-Werte lauten $3,21 \times 10^{-3}$ bzw. $2,7 \times 10^{-3}$. Beide ATP-Kurven unterscheiden sich bei gleichen K-Werten und somit gleichem ATP-Verbrauch nur durch die verschieden hohe CO₂-Produktion. Letzterer ist es auch zuzuschreiben, daß zunächst gering erscheinende Unterschiede im jeweiligen ATP-Verbrauch mit Hilfe einer dynamischen Größe wie der ATP-Produktionsrate wesentlich verstärkt werden.

c) K und die Stoffwechselleistung

Bringt man die K-Werte von völlig wahllos entnommenen Plaqueproben in Zusammenhang mit der Stoffwechselleistung, so fällt auf, daß eine ältere Bakterienkultur, wie eine reife Zahnplaque, einen ebenso großen, wenn nicht höheren ATP-Verbrauch als eine 22 Std. bzw. 46 Std. alte Bakterien-

einzelkultur besitzt. Dies beweist, daß auch in einer ruhen-
den Bakterienmischkultur erhebliche Umbauvorgänge stattfin-
den. Je größer der jeweilige ATP-Verbrauch und je kleiner K,
desto aktiver ist die angetroffene Plaque.

Viele Versuche wurden bis heute unternommen, die Kariesaktivität
mit Hilfe von Kariestesten zu bestimmen, und die meisten dieser
objektiv gewonnenen Versuchsergebnisse konnten mit der subjektivi-
ven, klinischen Untersuchung nicht in Einklang gebracht werden.

Will man die Kariesempfänglichkeit eines Patienten prüfen, so
muß man sich an den Ort der Säureproduktion begeben, die Plaque.
Solange allerdings mikrobiologische Bestimmungsmethoden nicht
wesentlich verfeinert werden, sind hochempfindliche, biochemische
Meßverfahren heranzuziehen, um in die Mikroflora der Zahnbeläge
vorzudringen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß eine willkürlich
entnommene Zahnplaque stark in ihrer bakteriellen Zusammensetzung
und damit in ihren K-Werten variiert. Die Größe der Konstanten K
einer gemischten Bakterienpopulation steht wiederum in engem Zu-
sammenhang mit der jeweiligen Stoffwechselleistung, indem sie
anaerobe ATP-Produktion und anaeroben ATP-Verbrauch in sich ver-
einigt.

Mit Hilfe von K dürfte es daher möglich sein, vergleichende Unter-
suchungen bezüglich der Stoffwechselaktivität an wahllos gewonne-
nen Plaques durchzuführen und diese in Beziehung zum klinischen
Zahnbefund zu setzen. Die hierzu notwendige Ermittlung der Pla-
quekonstante K wird dadurch erleichtert, daß man auf die mühevollen
und zeitraubende Bestimmung der CO_2 -Produktionsrate verzichten
kann, denn wie Tab. 1, Spalte 2 und Abb. 3 - 6, 10 u. 12, zeigen,
besitzt die CO_2 -Bildungsrate in allen 15 untersuchten Plaquepro-
ben eine konstante, durchschnittliche Größe von $0,22 \mu\text{l CO}_2/\text{mg}$
Plaque x min. Bleibt nur noch die initiale Anstiegsgeschwindig-
keit des ATP-pool zu bestimmen, die man in einem gewöhnlichen
Schüttelbad mittels der unkomplizierten und schnellen Luciferin-
Luciferase-Meßmethode ermitteln kann.

Durch Zufall konnte zweimal vom selben Probanden Plaque entnommen werden. Die CO_2 -Produktionsrate und initiale Anstiegsgeschwindigkeit wichen nur wenig voneinander ab, so daß sich in gleichen K-Werten eine ähnliche Mikroflora der Plaque widerspiegeln könnte.

Um diese Vermutung zu beweisen, werden weitere Untersuchungen an definierter Plaque folgen müssen.

F. Zusammenfassung

1. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem ersten, 15 min dauernden, linearen Anstieg des ATP-Spiegels und der konstant verlaufenden CO_2 -Produktionsrate nach Substratzufuhr bei einem stationären Bakterieneinzelstamm und einer bestimmten Plaqueprobe.
2. Unterschiedliche Anstiegsgeschwindigkeiten des ATP-pool von 2 Str. mutans-Stämmen und 15 wahllos entnommenen Plaqueproben konnten durch Einführung der bakterien- und plaquespezifischen Größe K erklärt werden.
3. K ist eine Bakterien- bzw. Plaquekonstante und gibt den Nettoeinfluß von Mol ATP pro erzeugten Mol H^+ in den ATP-pool nach Glukosezufuhr wieder. Seine Variabilität liegt in dem für jede Plaque- bzw. Str. mutans-Probe unterschiedlichen ATP-Verbrauch bei einer mittleren, anaeroben ATP-Produktion von $1,25 \text{ Mol ATP/Mol H}^+$ begründet.
4. Die durchschnittliche Größe von K in 15 Plaqueproben beträgt $0,8 \times 10^{-3} \text{ Mol ATP/Mol H}^+$ und setzt sich aus den verschiedenen Einzelkonstanten einer gemischten Bakterienpopulation zusammen. T3/53 und 441 besitzen K-Werte von $5,95 \times 10^{-3}$ bzw. $2,72 \times 10^{-3} \text{ Mol ATP/Mol H}^+$, so daß nach der Gleichung $\text{ATP}_{\text{verbr.}} = \text{ATP}_{\text{prod.}} - K$ der durchschnittliche ATP-Verbrauch in Plaque größer als in T3/53 und 441 ist.
5. $\text{ATP}_{\text{verbr.}}$ und damit K stehen in enger Beziehung zur Stoffwechselaktivität einer gemischten Bakterienkultur, so daß mit Hilfe von K ein Vergleich der Stoffwechsellaage von mehreren Plaqueproben möglich ist.
6. Die Bestimmung von K in Plaque begrenzt sich auf die Ermittlung der initialen Anstiegsgeschwindigkeit des ATP-Spiegels bei einer durchschnittlichen CO_2 -Produktionsrate von $0,22 \text{ µl CO}_2/\text{mg Plaque} \times \text{min.}$
7. K ist nur bis zum Beginn der Gegenregulation konstant, die

bei allen Plaque- und Str. mutans-Proben im Anschluß an den linearen Anstieg des ATP-pool durch Erhöhung von $ATP_{\text{verbr.}}$ bei konstant gebliebener $ATP_{\text{prod.}}$ erfolgt. K darf deshalb auch nur in diesem Zeitraum bestimmt werden.

8. Alle weiteren regulativen Maßnahmen beinhalten nur eine Änderung des ATP-Verbrauchs bei weiterhin konstanter ATP-Produktion:

Im Maximum der ATP-Kurve gilt, $ATP_{\text{prod.}} = ATP_{\text{verbr.}}$ und $K = 0$, während im exponentiellen Abfall $ATP_{\text{prod.}} < ATP_{\text{verbr.}}$ und $K < 0$ wird. Hat der ATP-Spiegel wieder eine konstante Höhe erreicht, ist $ATP_{\text{prod.}} = ATP_{\text{verbr.}}$ und wiederum $K = 0$.

9. Milieubedingte Schwankungen (pH, anaerobe Verhältnisse) des ATP-Spiegels in Plaque u. Str. mutans sind erheblich und müssen bei Bestimmung der initialen Anstiegsgeschwindigkeit berücksichtigt werden.

G. Literaturverzeichnis

- Ahrens, G., Bramstedt, F. und Naujoks, R., 1964: Zur Standardisierung einzelner Bezugsgrößen für biochemische Untersuchungen an Plaquematerial. - Adv. Fluorine Res. 2, 167.
- Bagnara, A.S. und Finch, L.R., 1972: Quantitative extraction and estimation of intracellular nucleoside triphosphates of *Escherichia coli*. - Anal. Biochem. 45, 24.
- Baldwin, R.L., 1970: Energy metabolism in anaerobes. - Amer. J. Clin. Nutr. 23, 1508.
- Beutler, E. und Baluda, M.C., 1964: Simplified determination of blood adenosine triphosphate using the firefly system. - Blood 23, 688.
- Bowden, G.H., Hardie, J.M. und Slack, G.L., 1975: Microbial variations in approximal dental plaque. - Caries Res. 9, 253.
- Bramstedt, F. und Trautner, K., 1971: Zuckeraustauschstoffe und Biochemie der Zahnplaques. - Dtsch. zahnärztl. Z. 26, 1135.
- Brovko, L.Yu., Ugarova, N.N., Vasil'eva, T.E., Dombrovskii, V.A. und Berezin, J.V., 1978: Use of immobilized firefly luciferase for quantitative determination of ATP and enzymes that synthesize and destroy ATP. - Biochemistry 43, 633.
- Buddecke, E., 1974: Grundriss der Biochemie für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und Naturwissenschaften. - Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1974.
- Burnett, G.W., Sherr, H.W. und Schuster, G.S., 1976: Oral microbiology and infectious disease 4. - The Williams u. Wilkins Company, Baltimore, 1976.

- Chapman, A.G., Fall, L. und Atkinson, D.E., 1971: Adenylat energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. - J. Bact. 108, 1072.
- Cheer, S., Gentile, J.H. und Hegre, C.S., 1974: Improved methods for ATP-analysis. - Anal. Biochem. 60, 102.
- Cole, H.A., Wimpenny, J.W.T und Hughes, D.E., 1967: The ATP-pool in *Escherichia coli*. I. Measurement of the pool using a modified luciferase assay. - Biochim. Biophys. Acta 143, 445.
- Conn, R.B., Charache, P. und Chappelle, E.W., 1975: Limits of applicability of the firefly luminescence ATP assay for the detection of bacteria in clinical specimens. - Amer. J. Clin. Path. 63, 493.
- Cortenbosch, R. und Schram, E., 1971: Improvements in the bioluminescence assay of ATP with firefly luciferase. - Arch. Int. Physiol. 79, 195.
- Dawes, C. und Jenkins, G.N., 1962: Some inorganic constituents of dental plaque and their relationship to early calculus formation and caries. - Arch. Oral Biol. 7, 161.
- Dietzler, D.N., Leckie, M.P. und Lais, C.J., 1973: Rates of glykogen synthesis and the cellular levels of ATP and FDP during exponential growth and the nitrogen - limited stationary phase of *Escherichia coli* W 4597 (K). - Arch. Biochem. 156, 684.
- Egelberg, J., 1970: A review of the development of dental plaque. - McHugh, W.D.: Dental plaque, E. u. S. Livingstone, Edinburgh u. London, 1970.
- Forrest, W.W., 1965: Adenosine Triphosphate pool during the growth cycle of *Streptococcus faecalis*. - J. Bact. 90, 1013.

- Forrest, W.W. und Walker, D.J., 1965 a: Control of glycolysis in washed suspensions of *Streptococcus faecalis*. - Nature 207, 46.
- Franzen, J.S. und Binkley, S.B., 1961: Comparison of acid - soluble nucleotides in *Escherichia coli* at different growth rates. - J. Biol. Chem. 236, 515.
- Gadkari, D. und Stolp, H., 1975: Energy metabolism of *Bdellovibrio bacteriovorus*. I. Energy production, ATP-pool, energy charge. - Arch. Microbiol. 102, 179.
- Gawronski, T.H., Staat, R.H. und Folke, L.E.A., 1973: Quantitation of human dental plaque by turbidimetry. - J. Dent. Res 52, 633.
- Gehring, F., 1969: Über das Säurebildungsvermögen und die Lebensfähigkeit von Plaquestreptokokken bei Rohrzuckerkonzentrationen von 5 - 70 %. - Dtsch. zahnärztl. Z. 24, 196.
- Gordin, N.F., Stutman, M. und Loesche, W.J., 1971: Improved isolation of anaerobic bacteria from the gingival crivice area of man. - Appl. Microbiol. 21, 1046.
- Grøn, P., Yao, K. und Spinelli, M., 1969: A study of inorganic constituents in dental plaque. - J. Dent. Res. 48, 799.
- Gülzow, H.-J. und Mardaus, D.W., 1973: Vergleichende Untersuchungen über organische Plaquebestandteile. - Dtsch. zahnärztl. Z. 28, 351.
- Hammerstedt, R.H., 1973: An automated method for ATP analysis utilizing the luciferin-luciferase reaction. - Anal. Biochem. 52, 449.
- Hardie, J., 1974: Anaerobes in the mouth. - Skinner und Carr: The normal microbial flora of man, Academic Press, London, 1974.

- Hemmens, E.S., Blayney, J.R., Bradel, S.F. und Harrison, R.W., 1946: The microbiotic flora of the dental plaque in relation to the beginning of caries. - J. Dent. Res. 25, 195.
- Hempfling, W.P., Hofer, M., Harris, E.J. und Pressman, B.C., 1967: Correlation between changes in metabolite concentrations and rate of ion transport following glucose addition to *Escherichia coli* B. - Biochim. Biophys. Acta 141, 391.
- Holms, W.H., Hamilton, J.D. und Robertson, A.G., 1972: The rate of turnover of the adenosine triphosphate pool of *Escherichia coli* growing aerobically in simple defined media. - Arch. Microbiol. 83, 95.
- Howe, P.R. und Hatch, R.E., 1917: A study of the microorganisms of dental caries. - J. Med. Res. 36, 481.
- Huh, C., Blackwell, R.Q. und Fordick, L.S., 1959: The diffusion of glucose through microbial plaques. - J. Dent. Res. 38, 569.
- Hunnekens, F.M. und Whitley, H.R., 1960: Phosphoric acid anhydrides and other energy-rich compounds. - Comp. Biochem. 1, 129. Florkin, M. und Mason, H., Academic Press, New York, 1960.
- Jantzen, H., 1974: Das Adenosinphosphat-System während Wachstum und Entwicklung von *Acanthamoeba castellanii*. - Arch. Microbiol. 101, 391.
- Jenkins, G.N., 1966: The influence of environmental fluids on enamel solubility. - J. Dent. Res. 45, 662.
- John, J.B.St., 1970: Determination of ATP in *Chlorella* with the luciferin-luciferase enzyme system. - Anal. Biochem. 37, 409.
- Johnson, R., Gentile, J.H. und Cheer, S., 1974: Automatic sample injector. Its application in the analysis of adenosine triphosphate. - Anal. Biochem. 60, 115.

- Kalbhen, D.A. und Koch, H.J., 1967: Methodische Untersuchungen zur quantitativen Mikrobestimmung von ATP in biologischem Material mit Firefly-Enzymsystem. - Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 5, 299.
- Karl, D.M. und Holm-Hansen, O., 1976: Effects of luciferin concentration on the quantitative assay of ATP using crude luciferase preparations. - Anal. Biochem. 75, 100,
- Karlson, P., 1974: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. - Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.
- Kellner, G., Ruzicka, F. und Schuh, E., 1979: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen über Entstehung und Wachstum von Plaques. - Zahnärztl. Prax. 30, 114.
- Kelley, D.P. und Syrett, P.J., 1966: Energy coupling during sulphur compound oxidation by *Thiobacillus* sp. strain. - J. Gen. Microbiol. 43, 109.
- Kenny, E.B. und Ash, M.M., 1969: Oxidation-reduction potential of developing plaque, periodontal pockets and gingival sulci. - J. Periodont. 40, 630.
- Kimmich, G.A., Randles, J. und Brand, J.S., 1975: Assay of picomole amounts of ATP, ADP, and AMP using the luciferase enzyme system. - Anal. Biochem. 69, 187.
- Klofat, W., Picciolo, G., Chapelle, E.W. und Freese, E., 1969: Production of adenosine triphosphate in normal cells and sporulation mutants of *Bacillus subtilis*. - J. Biol.-Chem. 244, 3270.
- Knowles, C.J. und Smith, L., 1970: Measurement of ATP-levels of intact *Azotobacter vinelandii* under different conditions. - Biochim. Biophys. Acta 197, 152.
- König, K., 1971: Karies und Kariesprophylaxe. - Goldmann Verlag, München, 1971.

- Lehninger, A.L., 1965: "Bioenergetics": The molecular basis of biological energy transformations. - Benjamin, W.A. S. 51, New York, 1965.
- Lundin, A., Rickardsson, A. und Thore, A., 1976: Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. - Anal. Biochem. 75, 611.
- Lyman, G.E. und DeVincenzo, J.P., 1967: Determination of picogram amounts of ATP using the luciferin-luciferase enzyme system. - Anal. Biochem. 21, 435.
- Mathis, R.R. und Brown, O.R., 1976: ATP concentration in *Escherichia coli* during oxygen toxicity. - Biochim. Biophys. Acta 440, 723.
- Maurer, G., 1981: Über den Adenosintriphosphatgehalt der Plaque: Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase-Biolumineszenz Reaktion. - Med Diss., Erlangen.
- McElroy, W.D., 1947: The energy source for bioluminescence in an isolated system. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 33, 342.
- Mota, J.M.S und Guerra, F.C., 1969: Action of some compounds on the adenosine triphosphate pool of *Streptococcus faecalis*. - Experientia 25, 141.
- Neufeld, H.A., Towner, R.D. und Pace, J., 1975: Rapid method for determining ATP by the firefly luciferin-luciferase system. - Experientia 31, 391.
- Nielsen, R. und Rasmussen, H., 1968: Fractionation of extracts of firefly tails by gel filtration. - Acta Chem. Scand. 22, 1757.
- Pilz, W., Plathner, C.H. und Taatz, H., 1969: Grundlagen der Kariologie und Endodontie. - Carl Hanser Verlag, München, 1969.

- Pilz, W., Plathner, C.H. und Taatz, H., 1975: Grundlagen der Kariologie und Endodontie.- Carl Hanser Verlag, München 1975.
- Poole, A.E., Gilmour, M.N. und Mills, J.R., 1967: The microbial content of natural and membrane plaques. - Caries Res. 1, 239.
- Poole, A.E. und Gilmour, M.N., 1971: The variability of unstandardized plaques obtained from single or multiple subjects. - Arch. Oral. Biol. 15, 681.
- Ranke, E., Ranke, B., Ahrens, G. und Heesch, W., 1967: Plaqueflora und Zahnkaries. - Dtsch. zahnärztl. Z. 22, 883.
- Ranke, E. und Ranke, B., 1970: Zur Bedeutung verschiedener Plaque-Streptokokken für die Karies. - Dtsch. zahnärztl. Z. 25, 270.
- Rasmussen, H. und Nielsen, R., 1969: An improved analysis of adenosine triphosphate by the luciferase method. - Acta Chem. Scand. 22, 3.
- Riedl, R., 1981: Über den ATP-Gehalt von Str. mutans-Zellen. - Med. Diss., Erlangen.
- Riethe, P., 1978: Plaque - ihre Bedeutung bei der Entstehung von Karies und Parodontopathien. - Blend-a-med Forschungsbericht: Die Bedeutung der Mundhygiene bei der Prophylaxe von Zahn- und Zahnbett-Erkrankungen.
- Robrish, S.A., Kemp, C.W. und Bowen, W.H., 1978: Use of extractable adenosine triphosphate to estimate the viable cell mass in dental plaque samples obtained from monkeys. - App. Environ. Microbiol. 35, 743.
- Rölla, G., 1976: Plaquebildung und Plaqueverhinderung. - Dtsch. zahnärztl. Z. 31, 840.

- Sauerwein, E., 1974: Kariologie mit kurzgefaßter Histologie und Histopathologie des Zahnes. - Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.
- Schroeder, H.E., 1969: Formation and inhibition of dental calculus. - Hans Huber Publishers Berne, Stuttgart, Vienna, 1969.
- Sharma, M.L. und Newbrun, E., 1975: Chemical composition of washed cells of *Streptococcus mutans*. - J. Dent. Res. 54, 482.
- Socransky, S.S., Gibbons, R.J., Dale, A.C., Bostnick, L., Rosenthal, E. und MacDonald, J.B., 1963: The microbiota of the gingival crevice area of man. - Arch. Oral Biol. 8, 275.
- Spiegel, S.J. und Tifft, E.C., 1977: Stability of reagents for use in an automated ATP bioluminescence assay system. - Academic Press 76, 586.
- Stouthamer, A.H., 1973: A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. - Antonie van Leeuwenhoek 39, 545.
- Stouthamer, A.H. und Bettenhausen, C., 1973: Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. A reevaluation of the method for the determination of ATP-production by measuring molar growth yields. - Biochim. Biophys. Acta 301, 53.
- Strålfors, A., 1950: Investigation into the bacterial chemistry of dental plaques. - Odontol. Tidskr. 58, no. 3 - 5.
- Strange, R.E., Wade, H.E. und Dark, F.A. 1963: Effect of starvation on adenosine triphosphate concentration in *Aerobacter aerogenes*. - Nature 199, 55.

- Strehler, B.L. und Totter, J.R., 1952: Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination. - Arch. Biochem. Biophys. 40, 28.
- Strugger, S., 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. - Jenaische Z. Naturwiss. 73, 97.
- Theilade, E. und Theilade, J., 1970: Bacteriological and ultra-structural studies of developing dental plaque. - McHugh, W.D.: Dental Plaque, 27 - 40, E.u.S. Livingstone, Edinburgh u. London, 1970.
- Theilade, E., Larson, R.H. und Karring, Th., 1973: Microbiological studies of plaque in artificial fissures implanted in human teeth. - Caries Res. 7, 130.
- Theilade, E., Fejerskov, O., Karring, T. und Theilade, J., 1978: A microbiological study of old plaque in occlusal fissures of human teeth. - Caries Res. 12, 313.
- Thore, A., Lundin, A.A. und Bergman, S., 1975: Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate. - J. Clin. Microbiol. 1, 1.
- Tsujimoto, T., Nakase, Y. und Sugano, T., 1970: Firefly luminescence for ATP-assay. - Wakayama Med. Rep. 14, 29.
- Wettermark, G., Stymne, H., Brodin, S.E. und Petersson, B., 1975: Substrate analyses in single cells. I. Determination of ATP. - Anal. Biochem. 63, 293.

H. Abbildungen und Tabellen

I. Abbildungen

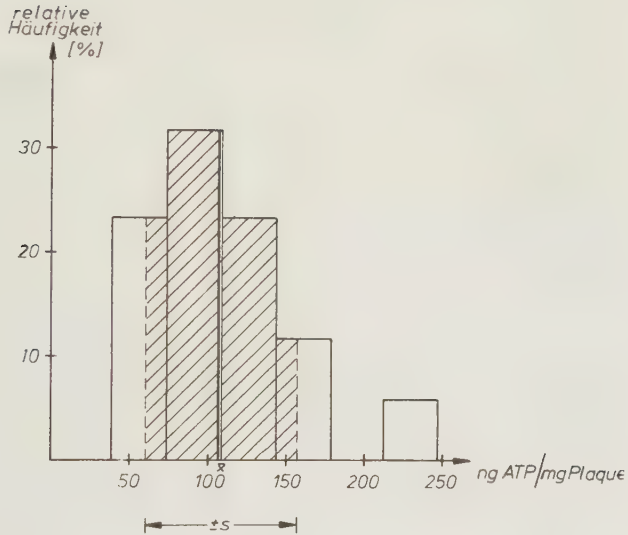


Abb. 2: Histogramm des ATP-Grundspiegels von 15 wahllos entnommenen Plaqueproben. $\bar{x} = 108,13$ ng ATP/mg Plaque; $s = 48,12$ ng ATP/mg Plaque; Anzahl der Klassen: 6; Klassenbreite: 35 ng ATP/mg Plaque.

Abb. 3 - 5: ATP-Spiegel und CO_2 -Produktion von Plaqueprobe 1.10, 1.1, 1.6 nach Pufferzugabe, Begasen und Zukippen von Glukose. Jeder eingezeichnete Punkt der ATP-Kurve ist der Mittelwert aus 2 ATP-Messungen.

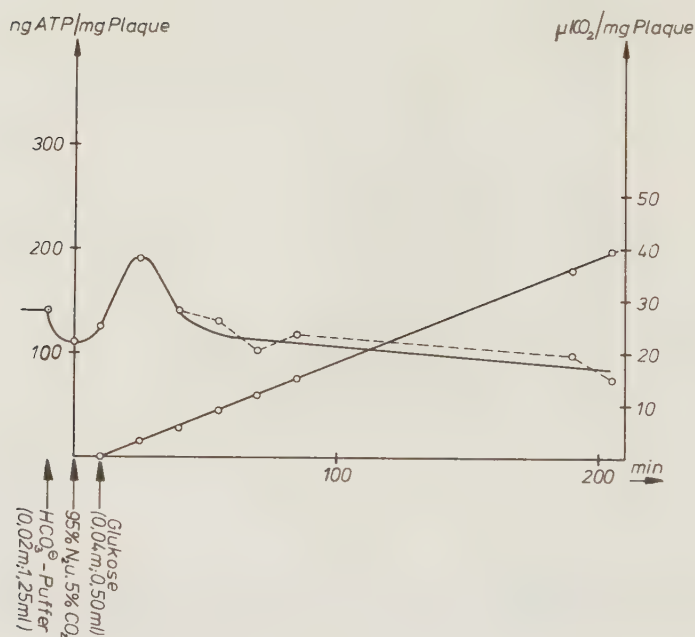


Abb. 3: Plaqueprobe 1.10. Analogen ATP-Kurvenverlauf zeigen Plaque 1.4, 1.5, 1.6, 1.9, 1.12, 1.13 und 1.14 (Typ I). CO_2 -Produktionsrate: $0,20 \mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque} \times \text{min}$; initiale Anstiegsgeschwindigkeit: $4,24 \text{ ng ATP}/\text{mg Plaque} \times \text{min}$.

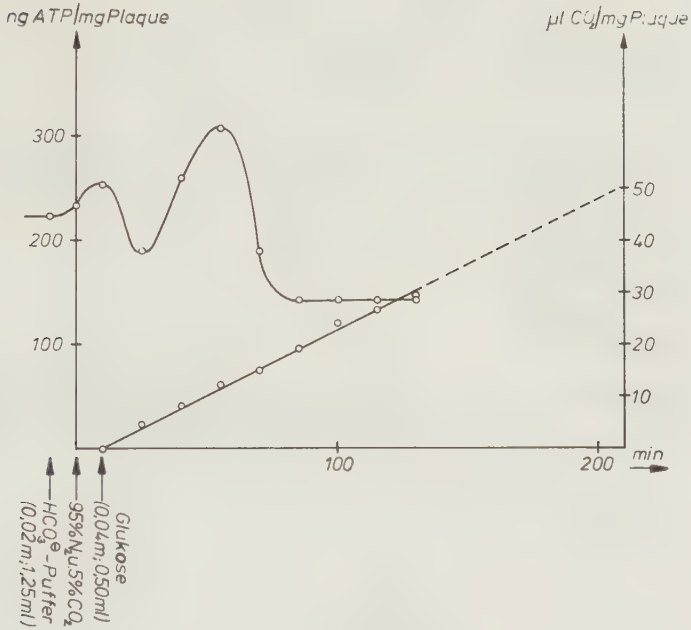


Abb. 4: Plaqueprobe 1.1. Analogen ATP-Kurvenverlauf zeigen Plaque 1.2, 1.3, 1.7, 1.8, 1.11 und 1.15 (Typ II).
 CO₂-Produktionsrate: 0,24 µl CO₂/mg Plaque x min;
 initiale Anstiegsgeschwindigkeit: 4,75 ng ATP/mg Plaque x min.

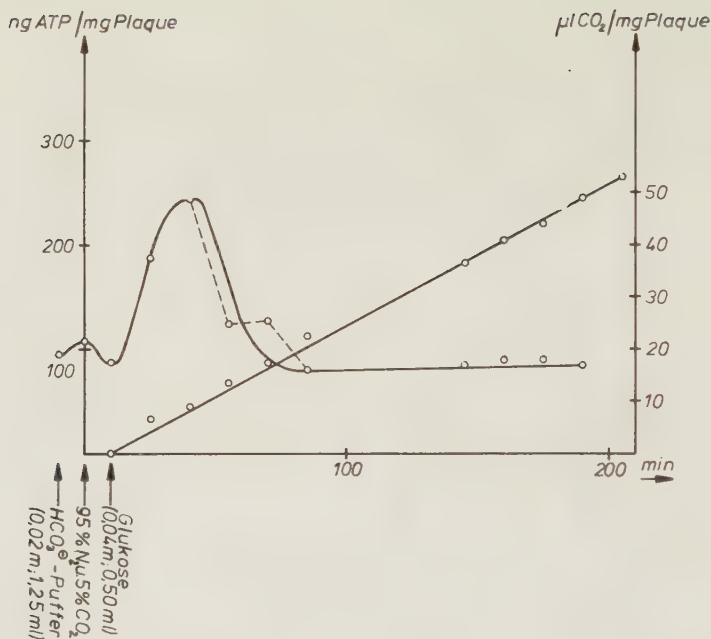


Abb. 5: Plaqueprobe 1.6. CO_2 -Produktionsrate: $0,26 \mu\text{l CO}_2 / \text{mg Plaque} \times \text{min}$; initiale Anstiegsgeschwindigkeit: $6,63 \text{ ng ATP} / \text{mg Plaque} \times \text{min}$.

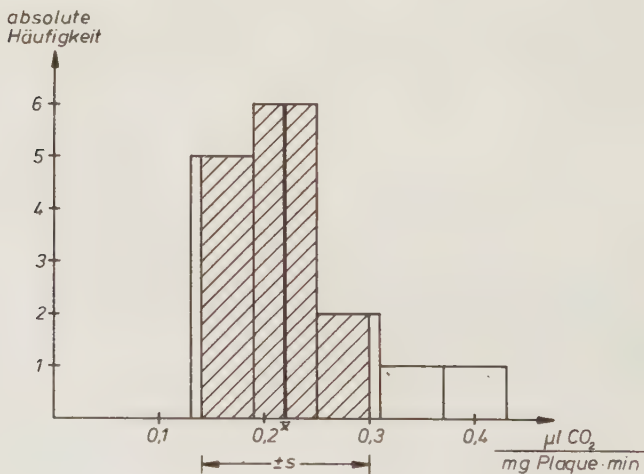


Abb. 6: Histogramm der CO_2 -Produktionsrate von 15 willkürlich gewonnenen Plaqueproben. $\bar{x} = 0,22 \mu\text{l CO}_2 / \text{mg Plaque} \times \text{min}$; $s = 0,08 \mu\text{l CO}_2 / \text{mg Plaque} \times \text{min}$; Anzahl der Klassen: 5; Klassenbreite: $0,06 \mu\text{l CO}_2 / \text{mg Plaque} \times \text{min}$.

Abb. 7 u. 8: ATP-Spiegel und CO_2 -Produktion von T3/53 (---○) und 441 (---●) nach Pufferzugabe, Begasen und Zukippen von Glukose. Jeder eingezeichnete Punkt der ATP-Kurven ist der Mittelwert aus 2 ATP-Messungen.

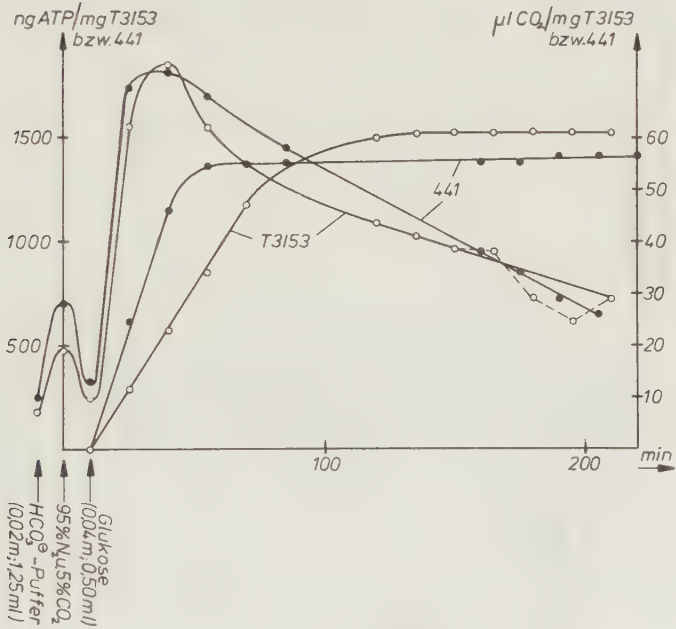


Abb. 7: T3/53 und 441, 22 Std. nach Beimpfen. CO_2 -Produktionsrate: T3/53 = 0,78 $\mu\text{l CO}_2/\text{mg} \times \text{min}$; 441 = 1,52 $\mu\text{l CO}_2/\text{mg} \times \text{min}$. Initiale Anstiegsgeschwindigkeit: T3/53 = 86,6 ng ATP/mg $\times$ min; 441 = 93,9 ng ATP/mg $\times$ min.

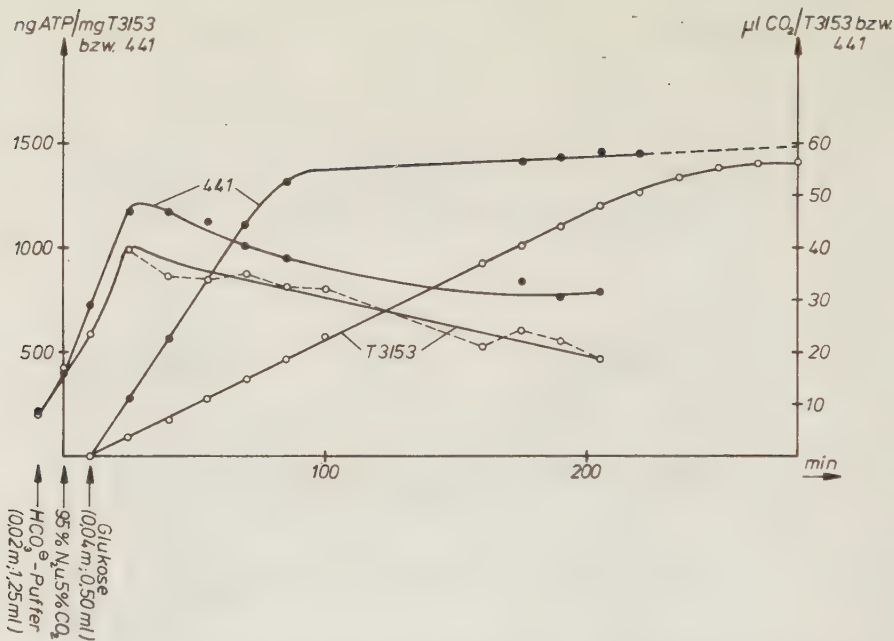


Abb. 8: T3/53 und 441, 46 Std. nach Beimpfen. CO_2 -Produktionsrate:
 T3/53 = $0,23 \mu\text{l CO}_2/\text{mg} \times \text{min}$; 441 = $0,70 \mu\text{l CO}_2/\text{mg} \times \text{min}$.
 Initiale Anstiegsgeschwindigkeit: T3/53 = $27,1 \text{ ng ATP}/\text{mg} \times \text{min}$;
 441 = $30,1 \text{ ng ATP}/\text{mg} \times \text{min}$.

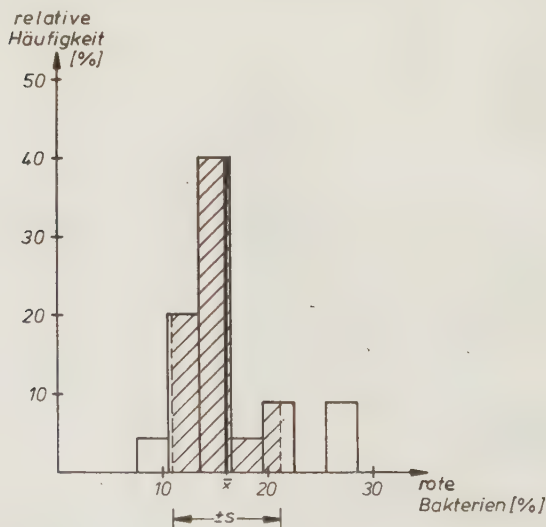


Abb. 9: Histogramm von % rote Bakterien (tot) in 15 wahllos entnommenen Plaqueproben. $\bar{x} = 16,13 \%$; $s = 5,18 \%$; Anzahl der Klassen: 7; Klassenbreite: 3 %.

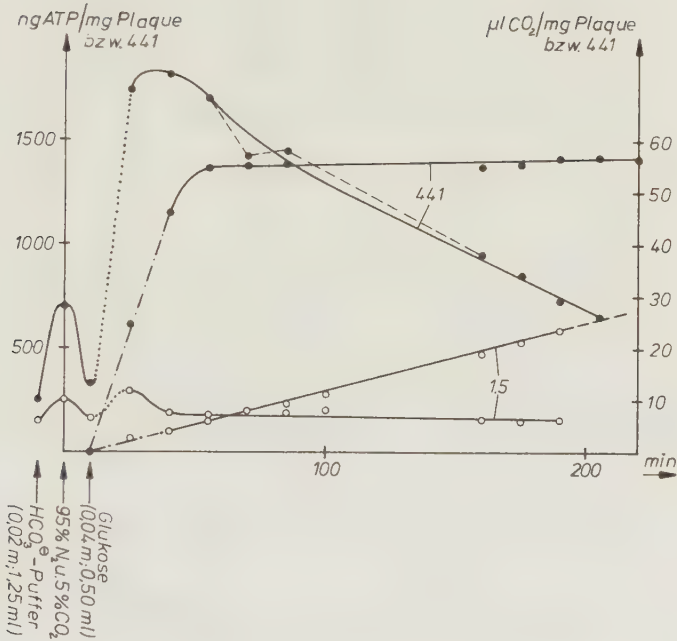


Abb. 10: ATP-Spiegel und CO₂-Produktion von Plaque 1.5 und Str. mutans-Stamm 441 (22 Std.) im Vergleich.
CO₂-Produktionsrate (---): 1.5 = 0,13 $\mu\text{l CO}_2/\text{mg Plaque} \times \text{min}$; 441 (22 Std.) = 1,52 $\mu\text{l CO}_2/\text{mg} \times \text{min}$. Initiale Anstiegsgeschwindigkeit (...): 1.5 = 6,82 ng ATP/mg Plaque $\times \text{min}$; 441 (22 Std.) = 93,9 ng ATP/mg $\times \text{min}$.
K: 1.5 = $2,7 \times 10^{-3} \text{ Mol ATP/Mol H}^+$; 441 (22 Std.) = $3,21 \times 10^{-3} \text{ Mol ATP/Mol H}^+$.

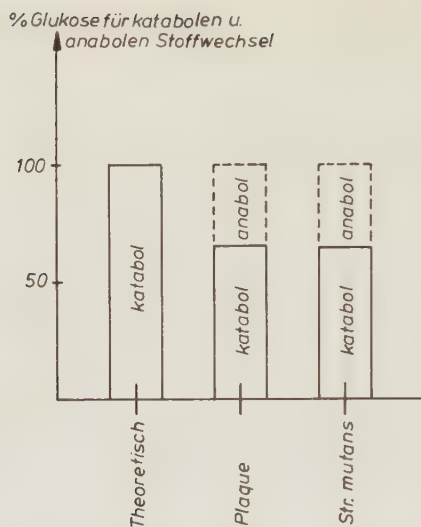


Abb. 11: Verhältnis von katabol zu anabol verbrauchter Glukose in Plaque und Str. mutans (T3/53 u. 441).

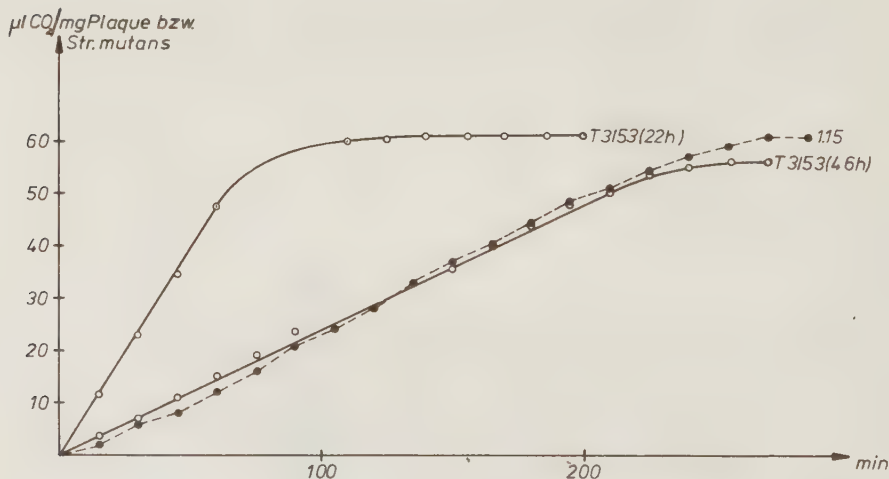


Abb. 12: CO₂-Produktionsraten von Plaque (1.15) und T3/53 (22 u. 46 Std.) im Vergleich. T3/53 (22 Std.) = 0,78 µl CO₂/mg x min (—○—); T3/53 (46 Std.) = 0,23 µl CO₂/mg x min (---○---); 1.15 (---●---) = 0,23 µl CO₂/mg Plaque x min.

Plaueprobe	$\frac{\mu\text{l CO}_2}{\text{mg Plaue} \cdot \text{min}}$	$\frac{\text{ng ATP}}{\text{mg Plaue} \cdot \text{min}}$	$\frac{\text{ng ATP}}{\mu\text{l CO}_2} = K^*$	$\frac{\text{Mol ATP}}{\text{Mol H}^+} = K$
1.1	0,24	4,75	19,8	$1,0 \cdot 10^{-3}$
1.2	0,16	2,13	12,3	$0,6 \cdot 10^{-3}$
1.3	0,36	3,39	9,4	$0,5 \cdot 10^{-3}$
1.4	0,21	0,53	2,5	$0,1 \cdot 10^{-3}$
1.5	0,13	6,82	52,5	$27 \cdot 10^{-3}$
1.6	0,26	6,63	25,5	$1,3 \cdot 10^{-3}$
1.7	0,27	10,88	40,3	$2,1 \cdot 10^{-3}$
1.8	0,14	0,19	1,4	$0,1 \cdot 10^{-3}$
1.9	0,14	0,34	2,4	$0,1 \cdot 10^{-3}$
1.10	0,20	4,24	21,2	$1,1 \cdot 10^{-3}$
1.11	0,19	2,00	10,5	$0,5 \cdot 10^{-3}$
1.12	0,16	1,12	7,0	$0,4 \cdot 10^{-3}$
1.13	0,42	1,64	3,9	$0,2 \cdot 10^{-3}$
1.14	0,23	2,53	11,0	$0,6 \cdot 10^{-3}$
1.15	0,23	0,79	3,3	$0,2 \cdot 10^{-3}$
Mittelwert	0,22	3,19	14,86	$0,8 \cdot 10^{-3}$

Tab. 1: CO_2 -Produktionsrate, initiale Anstiegsgeschwindigkeit, K^* und K von 15 wahllos entnommenen Plaueproben.

Stamm	Alter	Grundspiegel [ng ATP/mg Bakterien]	" HCO_3^- -Spiegel" [ng ATP/mg Bakt.]	" N_2/CO_2 -Spiegel" [ng ATP/mg Bakt.]
T3/53	22h	184	479	247
441	22h	248	694	328
T3/53	46h	205	429	584
441	46h	212	405	727
Mittelwert		212,25	—	—

Tab. 2: ATP-Grundspiegel, " HCO_3^- -Spiegel" und " N_2/CO_2 -Spiegel" von T3/53 und 441, 22 u. 46 Std. nach Beimpfen.

Stamm	Alter	$\frac{\mu\text{l CO}_2}{\text{mgBakterien}\cdot\text{min}}$	$\frac{\text{ngATP}}{\text{mgBakterien}\cdot\text{min}}$	$\frac{\text{ngATP}}{\mu\text{l CO}_2} = K^*$	$\frac{\text{Mol ATP}}{\text{Mol H}^+} = K$
T3/53	22h	0,78	86,6	111,0	$5,78 \cdot 10^{-3}$
T3/53	46h	0,23	27,1	117,8	$6,13 \cdot 10^{-3}$
441	22h	1,52	93,9	61,8	$3,21 \cdot 10^{-3}$
441	46h	0,70	30,1	43,0	$2,24 \cdot 10^{-3}$

Tab. 3: CO₂-Produktionsrate, initiale Anstiegsgeschwindigkeit, K* und K von T3/53 und 441, 22 und 46 Std. nach Beimpfen.

Stamm bzw. Plaqueprobe	$\frac{\mu\text{l CO}_2}{\text{mgPlaque bzw. Str. mutans}}$
1.14	57,00
1.15	61,40
T3/53 (22h)	60,91
T3/53 (46h)	56,04
441 (22h)	56,81
441 (46h)	57,91

Tab. 4: CO₂-Konzentration/CO₂-Ansatz von Plaque und Str. mutans (T3/53 und 441) nach vollständigem Verbrauch der zugefügten Glukose.

Herrn Prof. Dr. A. Kröncke danke ich für die
Überlassung des Themas und Herrn Dr. W. Distler
für die wertvollen Anregungen bei der
Durchführung der biochemischen Versuche.

Lebenslauf

Am 26. August 1955 wurde ich als Sohn des Ingenieurs
Vinzenz Greger und dessen Ehefrau, der Lehrerin
Helga Greger, geb. Adelman, in Marktredwitz geboren.

Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Volksschule in
Nürnberg und wechselte anschließend an das Neue Gymnasium
Nürnberg über. Nach einjährigem Aufenthalt als Austausch-
schüler an einer amerikanischen High School im Schuljahr
1972/73 legte ich 1975 die Reifeprüfung an meiner früheren
Schule ab.

Im Wintersemester 1975/76 begann ich an der Friedrich-
Alexander-Universität in Erlangen das Studium der Zahn-
medizin. Am 10. August 1976 bestand ich die naturwissen-
schaftliche und am 6. April 1978 die zahnärztliche Vor-
prüfung. Am 12. Dezember 1980 beendete ich erfolgreich
die zahnärztliche Prüfung.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197